

## **Tesis Doctoral**

# **CARACTERIZACIÓN DE LA POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR EN POBLACIÓN ESPAÑOLA: ESTUDIO DE FAMILIAS *APC/MUTYH* NEGATIVAS**

**BÁRBARA RIVERA POLO**

**Madrid, 2012**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**CARACTERIZACIÓN DE LA POLIPOSIS  
ADENOMATOSA FAMILIAR EN POBLACIÓN  
ESPAÑOLA: ESTUDIO DE FAMILIAS  
*APC/MUTYH* NEGATIVAS**

Tesis doctoral que presenta para optar al título de  
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid  
la Licenciada en Biología  
**Bárbara Rivera Polo**

Director de Tesis  
**Dr. Miguel Urioste Azcorra**



**GRUPO DE GENÉTICA HUMANA**  
**PROGRAMA DE GENÉTICA DEL CÁNCER HUMANO**  
**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS (CNIO)**





Dr. Miguel Urioste, Investigador del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), como Director,

CERTIFICA:

Que Doña Bárbara Rivera Polo, Licenciada en Biología por la Universidad de Salamanca, ha realizado la presente Tesis Doctoral “Caracterización de la poliposis adenomatosa familiar en población española: estudio de familias APC/MUTYH negativas” y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biología**, a cuyos efectos será presentado en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo su dirección, autorizando su presentación ante el Tribunal Calificador.

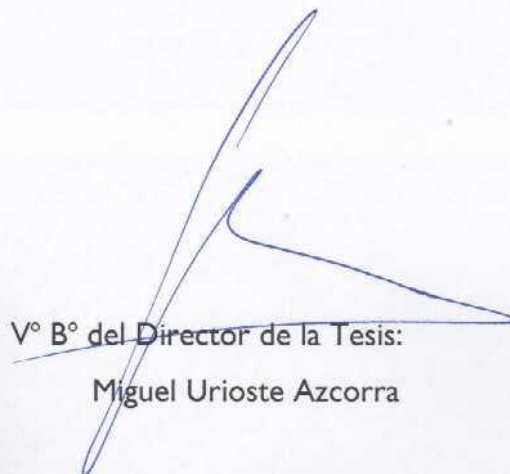
Y para que así conste se extiende el presente certificado,

Madrid, Julio 2012.



Vº Bº del Tutor de la Tesis:

Javier Benítez Ortíz



Vº Bº del Director de la Tesis:

Miguel Urioste Azcorra



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Grupo de Genética Humana del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), bajo la supervisión de Miguel Urioste Azcorra

Las siguientes ayudas han permitido la realización de la presente tesis doctoral:

- Contrato de Titulado Superior del Centro de Investigaciones Biológicas en Red de Enfermedades Raras-CIBERER.
- Ayuda de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia AP-2008-00344.
- Ayuda de estancia corta de la European Association of Cancer Research-Travel Award



**CARACTERIZACIÓN DE LA POLIPOSIS  
ADENOMATOSA FAMILIAR EN POBLACIÓN  
ESPAÑOLA: ESTUDIO DE FAMILIAS  
*APC/MUTYH* NEGATIVAS**

---



---

AGRADECIMIENTOS





A Todos los que de algún modo han contribuido a esta tesis.

Mil Gracias,

Bárbara







---









# ÍNDICE:

<b>ABREVIATURAS:</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT:</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN:</b>	<b>15</b>
<b>1. Poliposis Adenomatosa Familiar</b>	<b>16</b>
<b>2. Epidemiología</b>	<b>16</b>
<b>3. Características del síndrome</b>	<b>17</b>
3.1 PAF clásica.	17
3.2 PAF Atenuada (PAFA).	17
3.3 Criterios diagnósticos	18
3.4 Diagnóstico diferencial.	19
<b>4. Historia natural</b>	<b>20</b>
<b>5. Manifestaciones clínicas extracolónicas.</b>	<b>21</b>
5.1 Riesgo de neoplasias.	24
<b>6. Bases moleculares de la poliposis adenomatosa</b>	<b>24</b>
6.1 Gen <i>APC</i>	24
6.2 Gen <i>MUTYH</i>	26
6.3 Otros genes implicados en poliposis adenomatosa.	27
<b>7. Diagnóstico molecular</b>	<b>28</b>
<b>8. Correlación genotipo fenotipo</b>	<b>29</b>
<b>9. Importancia de las manifestaciones extracolónicas en el diagnóstico clínico</b>	<b>30</b>
<b>10. Familias con Poliposis Adenomatosa Familiar y estudio genético negativo.</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>PACIENTES Y DATOS CLÍNICOS.</b>	<b>39</b>
<b>1. Extracción de ADN y ARN.</b>	<b>39</b>
1.1 Extracción de ADN	39
1.2 Extracción de ARN.	39
1.3 Retro-transcripción de ARN a cADN	40
1.4 Extracción de ADN de tejido parafinado.	40
1.5 Extracción de ADN de tejido congelado	41
<b>2. Estudios moleculares de los genes <i>APC</i> y <i>MUTYH</i> y análisis de las características clínicas de los pacientes</b>	<b>42</b>

2.1 Estudios moleculares del gen <i>APC</i> .....	42
2.1.1 Genotipado mediante dHPLC .....	42
2.1.2 Genotipado por secuenciación directa .....	43
2.2 Estudio molecular del gen <i>MUTYH</i> .....	45
2.3. Análisis de grandes deleciones genómicas .....	47
2.3.1 Visualización .....	49
2.4 Análisis de las características clínicas de los distintos grupos de pacientes según su genotipo .....	50
<b>3. Estudios de expresión alélica diferencial en el gen <i>APC</i> .....</b>	<b>50</b>
3.1 Genotipado de muestras .....	50
3.2 <i>SnaPshot</i> análisis de ADN genómico .....	51
3.3 Medida de desbalance alélico: <i>SNaPshot</i> en cADN .....	51
<b>4. Estudios del Promotor de <i>APC</i> .....</b>	<b>52</b>
4.1 Análisis mutacional de los promotores IA y IB del gen <i>APC</i> .....	52
4.2 Análisis de metilación germinal de los promotores del gen <i>APC</i> .....	52
4.2.1. Modificación con bisulfito sódico .....	52
4.2.2 Amplificación de los promotores del gen <i>APC</i> en DNA modificado .....	53
4.2.3 Clonación del ADN modificado y transformación de bacterias .....	54
4.2.4. Visualización de colonias y crecimiento de bacterias en medio líquido .....	55
4.2.5. Minipreps y secuenciación. ....	55
<b>5. Estudios de segregación de marcadores flanqueantes al locus de <i>APC</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Estudio mutacional del gen <i>APC</i> en cADN .....</b>	<b>57</b>
<b>7. Análisis del 3'UTR del gen <i>APC</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>8. Estudio de mutaciones en los genes <i>AXIN2</i> y <i>GSK3<math>\beta</math></i> .....</b>	<b>58</b>
8.2. Amplificación del genoma completo mediante <i>GenomiPhiTM</i> .....	58
8.3. Amplificación de los genes <i>AXIN2</i> y <i>GSK3<math>\beta</math></i> .....	59
<b>9. Estudio de las variantes encontradas en el análisis mutacional de los genes <i>APC</i>, <i>AXIN2</i> y <i>GSK3<math>\beta</math></i> .....</b>	<b>61</b>
9.1 Mutaciones deletéreas o que afectan a las regiones de procesamiento alternativo del gen <i>APC</i> .....	62
9.2 Variantes de significado desconocido encontradas en las regiones reguladoras del gen <i>APC</i> .....	63
9.3 Estudio de posibles mosaicismos del gen <i>APC</i> .....	63
9.3.1. Test de proteína truncada en el exón 15 del gen <i>APC</i> .....	63
9.4 Variantes de significado desconocido (VSD) encontradas en los genes <i>AXIN2</i> .....	64
9.4.1 Estudio de la VSD Arg463Cys en el gen <i>AXIN2</i> .....	64

9.4.2 Estudio de la VSD Val317Phe en el gen <i>GSK3β</i> .....	65
9.5 Poblaciones control para el estudio de variantes mediante la tecnología de genotipación <i>KASPar</i> . ....	65
9.5.1 Plataforma de genotipado <i>KASPar</i> : .....	65
9.5.2. Protocolo específico de genotipado .....	67
9.5.3 Interpretación de los resultados de genotipado por <i>KASPar</i> .....	68
<b>10. Estudio de la patogenicidad de la variante R463P del gen <i>AXIN2</i> a nivel somático. ....</b>	<b>69</b>
10.1 Estudio de la pérdida de heterocigosidad (LOH) en ADN obtenido de pólipos parafinados <i>del probando</i> y su hermana afecta .....	69
10.2 Estudios de expresión de proteína a nivel de tejido Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia .....	70
<b>11. Las micromatrices de tejido (TMA) y estudio inmunohistoquímico .....</b>	<b>71</b>
11.1. Las micromatrices de tejido (TMA) .....	71
11.2 Estudio inmunohistoquímica (IHQ) .....	71
11.3 Selección de marcadores: .....	73
<b>12. Análisis de resultados y test estadísticos. ....</b>	<b>73</b>
12.1 Test estadísticos para comparar características clínicas de la serie completa de FAP en población española. ....	73
12.2 Análisis de agrupamiento o <i>clustering</i> no supervisado en los perfiles inmunohistoquímicos .....	74
12.3 Análisis supervisado de las muestras. ....	74
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>76</b>
<b>1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR EN FAMILIAS CON POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR DE TIPO CLÁSICO. ....</b>	<b>80</b>
1.1. Descripción de la serie y mutaciones en <i>APC</i> .....	80
1.2. Correlación genotipo-fenotipo .....	82
1.2.1 Edad de diagnóstico .....	82
1.2.2 Número de Pólipos .....	83
1.2.3 Manifestaciones extracolónicas. ....	83
1.2.4. Familias PAF con estudio genético negativo. ....	85
<b>2. ESTUDIO MOLECULAR EN FAMILIAS <i>APC/MUTYH</i> NEGATIVAS. ....</b>	<b>86</b>
2.1 Estudio del gen <i>APC</i> : .....	86
2.1.1 Extremo 3' del gen, promotores 1A y 1B y 3'UTR .....	87
2.1.2 Estudios de desbalance alélico, segregación con marcadores microsátélites y metilación de ambos promotores del gen <i>APC</i> .....	87

2.1.3 Estudio mutacional en cDNA. Búsqueda de mutaciones localizadas en regiones intrónicas .....	90
2.1.4 Estudio de posibles mosaicismos somáticos mediante el “Test de Proteína Truncada (PTT)” .....	91
2.1.5 Nuevo estudio de grandes reordenamientos del gen <i>APC</i> .....	92
2.2 Estudio validación de las variantes encontradas en el gen <i>APC</i> .....	92
2.2.1 Estudio de caracterización y validación de la mutación localizada en el intrón 3 de <i>APC</i> .....	96
2.2.2 Estudio de expresión inmunohistoquímica de $\beta$ -catenina y <i>APC</i> en pólipos. Estudio de LOH .....	100
2.3 Estudio del gen <i>MUTYH</i> .....	102
2.3.1 Estudio de mutaciones puntuales del gen <i>MUTYH</i> .....	102
2.3.2 Estudio de grandes reordenamientos del gen <i>MUTYH</i> .....	102
<b>3. ESTUDIO DE OTROS GENES WNT .....</b>	<b>103</b>
3.1 Estudio del gen <i>AXIN2</i> .....	103
3.1.1 Validación de la patogenicidad de la variante c.1387C>T .....	103
3.2 Estudio del gen <i>GSK3<math>\beta</math></i> .....	105
3.2.1 Validación de la patogenicidad de la variante c.950G>T en <i>GSK3<math>\beta</math></i> ..	106
<b>4. ESTUDIO DE GENES QUE NO PERTENECEN A LA VÍA WNT .....</b>	<b>107</b>
4.1 Cariotipado de pacientes .....	107
<b>5. PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS PÓLIPOS ADENOMATOSOS .....</b>	<b>108</b>
5.1 Agrupamiento no supervisado de las muestras .....	108
5.2.1 Agrupamiento no supervisado y comparación supervisada entre los perfiles IHQ de epitelios normales, adenomas y adenocarcinomas .....	111
5.2.2 Marcadores de progresión adenoma –adenocarcinoma.....	113
5.3 Agrupamiento no supervisado de los adenomas tempranos y tardíos .....	115
5.4 Comparación supervisada de los pólipos según su base genética .....	117
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>121</b>
<b>I. MUTACIONES EN <i>APC</i> .....</b>	<b>123</b>
I.1 Correlación genotipo-fenotipo. ....	124
<b>II. ESTUDIO MOLECULAR EN FAMILIAS <i>APC/MUTYH</i> NEGATIVAS .....</b>	<b>126</b>
II.1 Ampliación del estudio de <i>APC</i> .....	126
II.2 Estudio del gen <i>MUTYH</i> .....	131
<b>III. PAPEL DE OTROS GENES DE LA VÍA WNT EN LAS FAMILIAS <i>APC/MUTYH</i> NEGATIVAS .....</b>	<b>131</b>

III.1 Estudio del gen <i>AXIN2</i> .....	131
III.2 Estudio del gen <i>GSK3<math>\beta</math></i> .....	133
<b>IV.PAPEL DEL GEN <i>BUB1B</i> EN LAS FAMILIAS <i>APC/MUTYH</i> NEGATIVAS .....</b>	<b>134</b>
<b>V.ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS POLIPOS ADENOMATOSOS ..</b>	<b>135</b>
V.2 Perfil IHQ de la progresión desde un epitelio normal hasta un adenocarcinoma en cuatro fases: (Normal-Adenoma-Adenoma Alto grado de diferenciación-Carcinoma) .....	136
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>145</b>
<b>Material Suplementario.....</b>	<b>149</b>
<b>Test Estadísticos.....</b>	<b>155</b>
<b>Cuestionario y Consentimientos Informados .....</b>	<b>175</b>
<b>Árboles Familiares .....</b>	<b>190</b>
<b>Páginas Web.....</b>	<b>199</b>
<b>ANEXO II: PUBLICACIONES FRUTO DE ESTA TESIS.....</b>	<b>203</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>207</b>

---



---

BREVIATURAS





<b>APC</b>	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AINES</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ASE</b>	<i>Allelic Specific Expression</i>
<b>CCR</b>	Cáncer Colorrectal
<b>cDNA</b>	ADN copia
<b>CHPRE</b>	<i>Congenital Hypertrophy of the Pigmentary Retinal Epithelium</i>
<b>CNIO</b>	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
<b>DHPLC</b>	<i>Denaturing High Pressure Liquid Chromatography</i>
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EBS</b>	<i>Element Binding Site</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ESP</b>	Exome Sequencing Project
<b>FAP</b>	<i>Familial adenomatous Polyposis</i>
<b>FRET</b>	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia
<b>GST</b>	Gen Supresor de Tumores
<b>HCEPR</b>	Hipertrofia Congénita del Epitelio Pigmentario de la Retina
<b>HGMD</b>	<i>Human Gene Mutation Database</i>
<b>ICO</b>	Instituto Catalán de Oncología
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IHC</b>	<i>Immunohistochemistry</i>
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IVD-BMOD</b>	ADN Control Metilado Universal- Modificado por Bisulfito
<b>IVD-NMOD</b>	ADN Control Metilado Universal-No Modificado por Bisulfito
<b>LB</b>	<i>Luria Bertani Medium</i>
<b>LN-BMOD</b>	ADN Control de Linfocitos Normales- Modificado por Bisulfito
<b>LN-NMOD</b>	ADN Control de Linfocito Normales- No Modificado por Bisulfito
<b>LOH</b>	<i>Loss of Heterozygosity</i>
<b>MCC</b>	<i>Mitotic checkpoint Complex</i>
<b>MCR</b>	<i>Mutation Cluster Region</i>
<b>ME</b>	Manifestaciones Extracolónicas
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
<b>MMR</b>	Missmatch Repair Gene
<b>MUTYH</b>	<i>Mut Yeast Homologue</i>
<b>NMD</b>	<i>Nonsense Mediated Decay</i>
<b>PAAM</b>	Poliposis Adenomatosa Asociada a MUTYH
<b>PAF</b>	Poliposis Adenomatosa Familiar
<b>PAFA</b>	Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>

<b>PTC</b>	Papilar Thyroid Carcinoma
<b>PTT</b>	Test de la Proteína Truncada
<b>QMPSF</b>	<i>Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescence fragments</i>
<b>RT- PCR</b>	<i>Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SAC</b>	<i>Spindle Asembly Checkpoint</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNP</b>	<i>Single Nuclotide Polymorfism</i>
<b>TA</b>	Temperatura Ambiente
<b>TEEA</b>	Trietil- amonio-acetato
<b>TMA</b>	Micromatriz de tejido
<b>UGI</b>	Upper Gastrointestinal Polyps
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>VSD</b>	Variante de Significado Desconocido



---



**BSTRACT**



Colorectal cancer is the second most frequent form of cancer in the developed world, accounting for around 600.000 deaths in 2008. Hereditary colorectal cancer represents up to 5% of all CRC; and in particular, Familial Adenomatous Polyposis (FAP) is the second most common form of hereditary colorectal cancer amounting to 1% of all CRC cases. FAP is a truly hereditary condition that confers almost 100% CRC susceptibility and inherits in an autosomal dominant manner with near 100% of penetrance. There are two different forms of FAP: the classical one, diagnosed when the patient develops more than 100 polyps along the colorectum during the second or third decade of life, and the attenuated version that is characterized by the development of 10-99 polyps with a 10 year later onset.

Mutations in the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene are responsible for the great majority of the cases (50-80 %) depending on the phenotype of the patient. In 2002, the implication of *MUTYH* gene, a base excision repair gene was discovered in a small percentage of FAP cases (up to 30% of the *APC* negative cases), mainly attenuated forms. Still, in around 15-20% of the classical forms of FAP and in up to 50% of the attenuated phenotypes no mutation is found. This apparent negativity is partially due to a failure in the screening technique, but also it might be possible that other genes are underlying the genetic cause of these negative FAP patients.

In the present study we collected a Spanish series of FAP to fully clinically and molecularly characterize it and further study the previously described genotype –phenotype correlation. As a result of the characterization of the series we were able to identify a group of patients where no mutation was found and which showed clinical differences to the *APC* positives group. These negative cases represent a problem facing genetic counseling, but also it constitutes an interesting group of research. Therefore we hypothesized about the genetic origin of the syndrome in these families and focused our effort on the thorough investigation of these cases.

The fact that a genetic test results negative does not rule out the possibility of an aberration in *APC* or *MUTYH* existence. There are mutations and other mechanisms of inactivation of those genes that escape the available techniques in routine screening. Through an in depth study of those genes we were able to identify mutations in *APC* in around 40% of the patients. In order to test the possible implication of other genes in the syndrome, we selected two Wnt genes (*AXIN2* and *GSK3B*) and *BUB1B*, a SAC gene that interact with *APC* in chromosomal segregation and we were able to confirm the presence of variants in *AXIN2* and *GSK3B* that are likely related to the syndrome in two families.

As a final step, we have characterized a series of adenomatous polyps from *APC/MUTYH* negative patients and compared their expression profiles for a battery of proteins with *APC* and *MUTYH* positive polyps, oligopoliposis and sporadic adenomas to discard whether a specific profile in IHC expression is associated with the negative cases.





---



INTRODUCCIÓN



## 1. Poliposis Adenomatosa Familiar

Las formas hereditarias representan un 5% del total de cánceres colorrectales, con dos entidades principales: el Síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico, y la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) que suponen el 3% y el 1% de los cánceres colorrectales, respectivamente (Lynch 2012).

La PAF es un síndrome de predisposición al cáncer de colon, de herencia autosómica dominante. Un tercio de los casos de PAF no muestran antecedentes de la enfermedad en la familia y son considerados casos *de novo* (Rozen 2002), debido a mutaciones en el gen *APC* descrito en 1881 por Sklifasouski y, años después, por Smith (Nishisho 1991). Se caracteriza por la presencia de pólipos adenomatosos en el colon que aparecen en la segunda década de la vida, y que evolucionarán a cáncer en el 100% de los casos si no se adoptan medidas preventivas (Gardner 1951; Petersen 1991; Weitz 2005; Jasperson 2010). Junto a la poliposis suelen aparecer otras manifestaciones extracolónicas (Lida 1988; Thakker 1995; Kadmon 2001; Nieuwenhuis 2007; Alonso A 2010).

Su etiología comenzó a desentrañarse en 1986 con la publicación de Herrera (Herrera 1986), en la que describió una del(5q) en un paciente con poliposis y otras alteraciones. Posteriormente, en 1991, se identificaron mutaciones en el gen *APC* como responsables del fenotipo (Grodén 1991; Joslyn 1991). El tratamiento ha variado poco en los últimos 50 años, y, sigue siendo la intervención quirúrgica temprana junto al uso preventivo de antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

## 2. Epidemiología

La incidencia de PAF se estima en 1 caso cada 5.000-13.000 nacidos vivos (Fearnhead 2001), y una prevalencia de 2,29 por 100.000 habitantes (Lynch 1979; Nishisho 1991; Vasen 2008; Knudsen 2010). La prevalencia de la PAF en España es difícil de establecer con certeza; existen registros como el de Baleares, basado en un pequeño número de familias identificadas en esas islas, que establece una incidencia de PAF de 4,6 casos por millón de habitantes y por año, y una prevalencia de 38,16 casos por millón de habitantes en esa área geográfica (Llompert 1992; Reyes Moreno 2007).

### 3. Características del síndrome

Además de la PAF, existe otra forma de poliposis adenomatosa recientemente descrita, que se relaciona con mutaciones en el gen *MUTYH* (PAAM). Las características generales y el modelo de herencia de cada uno de estas dos entidades se resumen en la Tabla I-I.

Síndrome	Patrón de herencia	Fenotipos	Principal característica	Gen Responsable
<b>Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF)</b>	Autosómico dominante	<b>PAF Clásica</b>	Pólipos adenomatosos de colon, más de 100	<i>APC</i>
		<b>PAF Atenuada</b>	Pólipos adenomatosos de colon, entre 10 y 99	<i>APC</i>
		<b>Síndrome de Gardner</b>	Poliposis adenomatosa de colon asociada a otras manifestaciones extracolónicas	<i>APC</i>
		<b>Síndrome de Turcot</b>	Poliposis adenomatosa del colon asociada a tumores del SNC, principalmente meduloblastoma	<i>APC y MLH1, MSH2, etc</i>
<b>Poliposis Adenomatosa Asociada a <i>MUTYH</i> (PAAM)</b>	Autosómico recesivo	<b>Poliposis Colorrectal</b>	Pólipos adenomatosos de colon, principalmente entre 10 y 99, excepcionalmente entre 100 y 500	<i>MUTYH</i>

**Tabla I-I:** Síndromes de Poliposis Adenomatosa colorrectal

*SNC: Sistema Nervioso Central*

La PAF (OMIM#175100) (McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine), se caracteriza por presentar cientos a miles de pólipos adenomatosos en el colon, junto a una serie de manifestaciones extracolónicas variables (Nishisho 1991; Rustgi 2007). Existen dos presentaciones de la PAF atendiendo al número de pólipos:

#### 3.1.PAF clásica.

Se caracteriza por la presencia de más de cien pólipos adenomatosos distribuidos por todo el colon, incluidos sigma y recto, que aparecen, generalmente, antes de la segunda década de la vida y tiene un riesgo del 100% de progresar hasta cáncer de colon, que suele detectarse en torno a los 40 años, si no se adoptan medidas preventivas.

### 3.2. PAF Atenuada (PAFA).

Es una forma menos severa de la enfermedad, caracterizada por la presencia de entre 10 y 99 pólipos, un promedio de 30, localizados generalmente en la región más proximal del colon. La edad de diagnóstico del cáncer de colon suele ser entre los 50 y los 55 años, unos 15 años más tarde que en la PAF clásica. Las manifestaciones extracolónicas suelen aparecer con menor frecuencia, siendo las más comunes los adenomas gástricos y duodenales, y es poco frecuente la hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina. El riesgo acumulado de desarrollar cáncer colorrectal es aproximadamente del 70%, hasta la edad de 80 años (Knudsen AL 2003; Lynch 2003; Knudsen 2010).

Los síndromes de Gardner (OMIM#175100) y de Turcot (OMIM#175100 y 278300) son variantes clínicas de la PAF. El primero fue descrito en 1951 y se caracteriza por presentar PAF clásica asociada a osteomas, quistes sebáceos y tumores desmoides (Gardner 1951). El de Turcot se sospecha clínicamente cuando la poliposis aparece asociada a tumores del sistema nervioso central (SNC). El síndrome puede deberse tanto a mutaciones en el gen *APC*, como a mutaciones en uno de los genes reparadores de los errores de emparejamiento del ADN, cuyas mutaciones son responsables del síndrome de Lynch. Clínicamente se puede observar la presencia de tumores del SNC, como el meduloblastoma, en individuos con mutaciones en *APC*, mientras que en los individuos con mutaciones en los genes reparadores es más frecuente el glioblastoma multiforme (Hamilton SR 1995; Paraf 1997).

Por su parte, la Poliposis Adenomatosa asociada a *MUTYH* (OMIM #608456), debe sospecharse en un individuo sin antecedentes familiares de poliposis que presenta entre 10 y 99 pólipos adenomatosos de colon después de los 25 años (muy similar a la PAFA), o cuando se identifica un patrón de herencia autosómico recesivo. El síndrome es consecuencia de mutaciones bialélicas en el gen *MUTYH* y el riesgo de desarrollar cáncer de colon es similar al de la PAF (Sieber 2003).

### 3.3. Criterios diagnósticos

El diagnóstico clínico de la PAF se basa, fundamentalmente, en dos criterios: la edad de debut de la enfermedad y el número de pólipos. La presencia o ausencia de manifestaciones extracolónicas no forma parte de los criterios para el diagnóstico, pero sirven de ayuda para subclasificar la enfermedad o para orientar el estudio genético.

**PAF clásica.** Debe presentar alguno de los siguientes criterios (Alonso A 2010):

- Cien o más pólipos adenomatosos de colon diagnosticados antes de los 40 años.
- En menores de 20 años, más de 20 pólipos adenomatosos y un progenitor afecto.

**PAFA.** Existen dos criterios que pueden emplearse:

Criterios de Nielsen *et al* (Nielsen M 2007):

- Dos familiares mayores de 30 años con un número de adenomas entre 10 y 99.
- Un paciente con adenomas en colon, entre 10 y 99, mayor de 30 años y un familiar de primer grado con cáncer colorrectal con pocos adenomas

Criterios de Knudsen and Bülow (Knudsen AL 2003):

- Patrón de herencia autosómico dominante.
- Entre 3 y 99 adenomas a los 20 años o más.

**PAAM** (Alonso A 2010):

- Más de 15 pólipos adenomatosos colorrectales
- Más de 5 pólipos adenomatosos colónicos antes de los 60 años e historia familiar de cáncer de colon.

El criterio más determinante para distinguir la PAFA de la PAAM es el modelo de herencia: si es dominante probablemente sea una PAFA, mientras que el modelo recesivo hace pensar en la PAAM.

### 3.4. Diagnóstico diferencial.

La PAF se debe diferenciar de otros síndromes polipósicos y de predisposición al cáncer de colon.

- **Síndrome de Lynch.** Asociado a cáncer de colon a edades tempranas, en ocasiones con pólipos adenomatosos con un patrón de herencia autosómico dominante. El número de pólipos es por lo general reducido, suelen ser de mayor tamaño que los pólipos esporádicos y presentan ciertas características histológicas, como un patrón de crecimiento vellosos, alto grado de displasia y progresión rápida de adenoma a carcinoma (Alonso A 2010).

En el síndrome de Lynch, los CCR suelen localizarse en colon derecho y son frecuentes otras neoplasias en el mismo individuo o en familiares, como las de endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, vías hepatobiliares, tracto urinario, cerebro, piel, etc (Lynch 1979; Lynch 1999). El patrón de neoplasias extracolónicas asociadas al síndrome de Lynch es en parte similar al descrito en la PAAM, aunque esta última entidad sigue un modelo de herencia recesivo, como ya se ha indicado (Vogt 2009).

- **Síndrome de Turcot.** Se trata de una entidad genéticamente heterogénea, puede ser una variante de la PAF, generalmente asociada a meduloblastoma, mientras que un tercio de los casos es debido a mutaciones en los genes reparadores del ADN. En estos últimos



casos es más frecuente observar glioblastomas y la presencia de pólipos es menor que cuando se asocia a mutaciones en *APC* (Hamilton SR 1995; Paraf 1997).

- **Síndrome de Peutz-Jeghers.** El diagnóstico diferencial se basa en la presencia de las alteraciones características del síndrome como es la hiperpigmentación mucocutánea en labios y boca. La poliposis asociada al síndrome es hamartomatosa, y generalmente, aparece en la niñez. Es una entidad autosómica dominante causada por mutaciones en el gen *STK11* (Peutz 1921; Jeghers 1949).

- **Síndrome de Poliposis Juvenil.** Se caracteriza por la presencia de diferentes tipos de tumores, entre los que se pueden encontrar un número variable de pólipos hamartomatosos, en el tracto gastrointestinal, especialmente en el estómago, intestino delgado y colon. Muestra un patrón de herencia autosómico dominante y los genes que se encuentran mutados, en el 40% de los casos, son *SMAD4* o *BMPRI A* (Handra-Luca 2005).

- **Síndrome *PTEN*-Tumores hamartomatosos.** Esta entidad agrupa a síndromes clínicamente diferentes como son el de Cowden (SC), el de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRR), el de Proteus y el Proteus-like, y alguno más, que, en distintas proporciones, son producto de mutaciones en el gen *PTEN* (Marsh 1999; Blumenthal 2008). Todos ellos tienen como característica principal la presencia de tumores hamartomatosos y rasgos como macrocefalia, lesiones en mosaico, sobrecrecimientos corporales, lesiones cutáneas, etc, cuya presencia es muy útil de cara al diagnóstico diferencial con la PAF. Tanto el SC como el BRR son entidades autosómicas dominantes, mientras que el Proteus es esporádico (Marsh 1999; Blumenthal 2008).

- **Poliposis Hiperplásica.** Se caracteriza por la presencia de un número variable de pólipos en el colon, algunos miden más de 10mm, que histológicamente pueden ser clasificados como pólipos hiperplásicos o pólipos serrados. Su patrón de herencia no está claramente definido y la mutación genética en línea germinal no ha sido identificada (Buchanan). En relación con el diagnóstico diferencial, es conveniente recordar que es frecuente encontrar pólipos hiperplásicos, junto a adenomatosos, en pacientes con PAAM (Jasperson 2010)

#### 4. Historia natural

Los pólipos adenomatosos de colon, en individuos portadores de mutación en el gen *APC*, suelen aparecer en la segunda década de la vida, en torno a los 16 años como media, excepcionalmente se han descrito en menores de 10 años (Petersen 1991; Weitz 2005). Una

vez que aparecen, su número va en aumento hasta varios cientos o miles en el transcurso de pocos años, sin tratamiento progresan inevitablemente a cáncer colorrectal, que suele ser diagnosticado en torno a los 35-45, en la PAF clásica, y 10-15 años después en la PAFA (Petersen 1991). En la PAAM la aparición de los pólipos suele ser sobre los 20 años, como en la PAFA, y el CCR suele diagnosticarse entre los 45 y los 60 años.

## 5. Manifestaciones clínicas extracolónicas.

Además de los pólipos y el cáncer colorrectal, un elevado porcentaje de los pacientes con estos síndromes muestran otras manifestaciones fuera del colon. La mayoría son benignas, sin embargo otras como el hepatoblastoma, los tumores desmoides y los pólipos en tracto digestivo superior son hoy en día, las causantes de una alta morbi-mortalidad en estos pacientes. El tipo de manifestación clínica, la edad de presentación y la frecuencia de estas manifestaciones son muy variables, y distintas entre PAF y PAAM. Las principales manifestaciones extracolónicas y su frecuencia pueden consultarse en la Tabla I-2

Manifestaciones extracolónicas	PAF	PAAM
	Porcentaje de casos	Porcentaje de casos
HCEPR**	70-75	-
Osteomas y alteraciones dentales	70-90	-
Pólipos en tubo digestivo superior		
Duodeno	50- 90	21
Glándulas fúndicas gástricas	40-50	14
Antro gástrico	5-20	-
Quistes epidermoides y lipomas	25-50	-
Tumor desmoide	10-15	0
Otros tumores malignos (tiroides, hepatoblastoma, tumor cerebral)	3	-

**Tabla I-2.** Manifestaciones extracolónicas en PAF y PAAM\*

\*Adaptada de Nieuwenhuis and Vasen(Nieuwenhuis 2007)\*\*HCEPR: Hipertrofia Congénita del Epitelio Pigmentario de la Retina.

**Hipertrofia Congénita del Epitelio Pigmentario de la Retina (HCEPR).** Es una alteración benigna muy común en los pacientes con PAF (Nieuwenhuis 2007). Los afectados no presentan síntomas por lo que es necesaria una exploración oftalmológica para su detección. Se ha observado en niños de 3 meses de edad y se considera que puede estar presente desde el nacimiento. Cuando se relaciona con mutaciones del gen *APC* suele ser múltiple y bilateral (Traboulsi 1987; Chen 2006).

**Poliposis duodenal.** Es la segunda manifestación extracolónica en orden de frecuencia. Suele aparecer unos 15 años después de las manifestaciones colónicas, afectando la región periampular. En el 5% de los casos los pólipos duodenales malignizan entre la quinta y sexta décadas de la vida y son la principal causa de muerte oncológica, en pacientes colectomizados (Lida 1988; Wallace MH 1998; Offerhaus 1999; Kadmon 2001).

**Poliposis gástrica.** Se presentan como pólipos de las glándulas fúndicas. Pueden ser pólipos hiperplásicos o adenomas gástricos y algunos estudios realizados en población japonesa, describen un incremento del cáncer gástrico relacionado con su presencia (Offerhaus 1992; Offerhaus 1999).

**Osteomas.** Los osteomas son proliferaciones de hueso compacto o medular de carácter benigno, que aparecen frecuentemente en cráneo y mandíbula e incluso en los huesos largos (Gardner 1953; Thakker 1995; Reyes 2002; Chimenos-Kustner 2005; Bisgaard 2006; Nieuwenhuis 2007). Se pueden presentar a partir de la niñez, incluso antes de la aparición de los pólipos adenomatosos, con mayor frecuencia en el maxilar inferior aunque pueden aparecer en cualquier tejido óseo, sin ocasionar problemas clínicos. No se han descrito casos de malignización (Utsunomiya 1975).

**Quistes epidermoides.** Son lesiones benignas del tejido subcutáneo. Aunque se observan en población general, en los pacientes PAF su localización suele ser distinta (extremidades, cara o cuero cabelludo) y su aparición más temprana (Leppard 1975).

**Alteraciones dentales.** Algunas pueden aparecer en los primeros años de vida, como la ausencia de erupción dentaria o la presencia de dientes supernumerarios, otras aparecen más tarde, como la presencia de múltiples quistes dentarios, incluyendo odontomas (Jarvinen 1982; Carl 1987).

**Tumores desmoides.** Son tumores benignos que asientan en el mesenterio, pared abdominal o cualquier tejido blando. Pueden aparecer en la infancia o en la edad adulta, esporádicamente o tras alguna intervención quirúrgica (Clark 1999; Nieuwenhuis 2007; Vasen 2008). Se consideran un factor importante en la morbilidad y mortalidad en los pacientes con PAF, porque durante su crecimiento pueden comprometer diferentes sistemas y tejidos como el gastrointestinal, genitourinario, vascular y nervioso (Wehrli 2001; Half 2009). Algunos estudios sugieren cierta tendencia a la agregación familiar y una mayor frecuencia en mujeres (Reitamo 1986; Janinis 2003)

En la PAAM se observan manifestaciones extracolónicas en alrededor del 30% de los pacientes, según los estudios con mayor número de casos (Nielsen 2005; Vogt 2009).

Principalmente se describen adenomas duodenales y poliposis de glándulas fúndicas. Los datos reales de frecuencias son muy escasos debido a la carencia de estudios con un número suficiente de casos. Sí existen sin embargo, varias publicaciones en las que se han descrito distintas manifestaciones intra- y extraintestinales como los pólipos duodenales y gástricos, o los carcinomas duodenales (Isidro 2004). Dentro de las alteraciones benignas, se han comunicado casos de HCEPR, osteomas, adenomas sebáceos, pilomatrixomas aunque no es mucha la información existente (Sieber 2003; Baglioni 2005). Las neoplasias extracolónicas recogidas en la literatura incluyen carcinomas sebáceos, cáncer de mama y endometrio (Isidro 2004; Barnetson 2007; Tricarico 2009).

MANIFESTACIONES EXTRACOLÓNICAS	Frecuencia (%)	Incidencia	Riesgo acumulado (%)
Pólipos duodenales	26/150 (17)		
Pólipos gástricos	17/150 (11)		
Cáncer Duodenal	2/150 (2)		
cáncer gástrico	3/150 (3)		
Cáncer de esófago	2/150 (2)		
<b>CANCERES EXTRACOLÓNICOS</b>			
Esófago	2/150 (2)	5,5	2
Estómago	3/276	4,2	1
Duodeno	2/150 (2)	129	4
Vejiga	4/276 (1,5)	7,2	6
Piel	13/276 (5)	2,8	17
Pulmón	2/276	0,6	3
Mama en mujeres	8/118 (7)	2,1	25
Mama en hombres	1/158	53,5	1,5
Ovario	3/118 (2,5)	5,7	10
Endometrio	2/118 (1,7)	2	3
TODOS los cánceres extracolónicos		1.9	38
<b>TUMORES BENIGNOS</b>			
Adenomas sebáceos/ epiteloma	5/276 (1,8)		
Quistes epidermoides/ateroma	3/276 (1)		
Otros tumores benignos de piel	22/276 (8)		
Lipoma	8/276 (3)		
Tumor endometroide benigno	4/118 (3,4)		
Tumor mama benigno	4/118(3,4)		

**Tabla I-3.** Resumen de las manifestaciones extracolónicas asociadas a PAAM.

*Tabla adaptada de Vogt et al (Vogt 2009)*

En la Tabla I-3 se resumen las manifestaciones extracolónicas asociadas a PAAM que se han descrito como mínimo dos veces en la misma serie de pacientes (Vogt 2009). Existe también una amplia serie de manifestaciones que se han descrito sólo en un paciente (Vogt 2009).

## 5.1. Riesgo de neoplasias

El riesgo para CCR es muy elevado en todas las formas de poliposis adenomatosa. Pero además del riesgo para CCR, los pacientes con la enfermedad tienen riesgos para otras neoplasias. En la Tabla I-4 se muestran estos riesgos (Hughes 1992; Burt 1993; Giardiello 1996; Groves 2002; Truta 2005; Herraiz 2007).

	PAF CLÁSICA	PAFA	PAAM
<b>Colon</b>	100	70	80
<b>Hepatoblastoma</b>	1-2	?	?
<b>Duodeno</b>	4-12	4-12	4
<b>Estómago</b>	<1	?	1
<b>Páncreas</b>	2	?	?
<b>Tiroides</b>	1-2	1-2	?
<b>Meduloblastoma</b>	<1	?	?

**Tabla I-4.** Riesgos de neoplasias en pacientes con Poliposis Adenomatosa.

*Tabla de adaptada de Jasperson et al (Jasperson 2010)*

## 6. Bases moleculares de la poliposis adenomatosa

### 6.1. Gen APC

El origen de la PAF se debe a mutaciones en el gen APC (Adenomatous Poliposis Coli), localizado en la región cromosómica 5q21-q22, que fue identificado y clonado en 1991 (Grodin 1991; Joslyn 1991; Nishisho 1991; Kinzler 1996).

El gen APC es un gen supresor de tumores (GST) que codifica para una proteína que, en su isoforma más frecuente, tiene 2843 aminoácidos. La proteína Apc cumple funciones importantes en la ruta de señalización Wnt, y se relaciona con procesos celulares como la apoptosis, diferenciación neuronal, adhesión y migración celular, así como en la segregación de los cromosomas (Hanson 2005).

La ruta Wnt está implicada en desarrollo y diferenciación y consta de al menos 3 vías diferentes de las cuales la principal se conoce como vía canónica (*Canonical Wnt pathway*) en la que Apc desempeña un papel central ([www.genome.jp/dbgetbin/www\\_bget?pathway+hsa04310](http://www.genome.jp/dbgetbin/www_bget?pathway+hsa04310)). Apc junto con Axin2, Gsk3- $\beta$  y CasK forma el “complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina”, marcándola para su degradación por el proteosoma. Cuando APC está mutado, la  $\beta$ -catenina se acumula en exceso en el citoplasma y pasa al núcleo. Su acumulación en el núcleo hace que interaccione con TCF lo que provoca una activación continua del oncogén c-MYC.

Mutaciones en APC explican la mayoría de los casos con PAF, con claras diferencias en las tasa de mutación detectadas entre las formas de PAF clásica, aproximadamente un 75-85% (Rozen 2002), y atenuada, alrededor del 30-50% (Moisio 2002; Bertario 2003).

En población española existen varios trabajos que describen unas frecuencias mutacionales del gen APC que van desde el 35,3% en población gallega (Ruiz-Ponte 2001); 39% en un estudio realizado en Cataluña y Galicia (Gomez-Fernandez 2009); 83% en población balear (Gonzalez 2005); y 86,7% descrito en el sur de España (Garcia-Lozano 2005).

La mayoría de las mutaciones en APC se concentran en la mitad 5' del gen, y, además, existen zonas altamente mutables como la región MCR (*Mutation Cluster Region*). Los codones 1061 y 1309 del MCR son puntos especialmente “calientes” por la presencia de secuencias altamente repetitivas, donde la posibilidad de fallos de la polimerasa es mayor.

Como sucede en otros genes supresores de tumores, las alteraciones del gen APC siguen el modelo de los dos *hits* formulado por Knudson (Knudson 1971; Knudson 2001). Según esta hipótesis para que el cáncer se desarrolle es necesario que ocurran dos eventos mutacionales. En las enfermedades hereditarias como la PAF, la primera mutación es heredada y por lo tanto constitucional, y la segunda es una mutación somática en el otro alelo del gen, que da lugar al desarrollo del tumor.

En la PAF se piensa que las características del primer *hit* mutacional condicionan el segundo. Así la mutación germinal, la heredada, influye en el tipo y la localización de la mutación somática. Según Lamlum *et al* (Lamlum 1999), distintas mutaciones en el gen APC confieren a la célula ventajas evolutivas diferentes, siendo las mutaciones en torno al codón 1300 las más representativas de esta circunstancia (Rubinfeld 1997; Laurent-Puig 1998). Cuando se hereda una mutación en el codón 1300, el segundo *hit* acostumbra a ser la pérdida de heterocigosidad, que supone la pérdida del alelo salvaje, la conservación del alelo con la mutación truncante y el desarrollo de un fenotipo más severo. Por su parte en las mutaciones germinales fuera del MCR el segundo *hit* suele ser a una mutación somática en

las proximidades del codón 1300 en vez de la pérdida alélica (Lamlum 1999; Crabtree 2003; Heinen 2009). En estos casos podría ocurrir un tercer *hit* consistente en la pérdida alélica del alelo mutado germinalmente para que de esta manera, la célula conserve la mutación en el MCR que para ella es la más ventajosa.

La razón por la que unos alelos confieren mayor o menor ventaja a la célula, probablemente esté en el balance entre la unión y la degradación de la  $\beta$ -catenina o, quizás, en un balance entre los dominios N y C-terminal de APC y sus distintas funciones, entre las que figuraría un efecto dominante negativo de algunos alelos (Rubinfeld 1997; Laurent-Puig 1998; Gomez-Fernandez 2009).

## 6.2. Gen *MUTYH*

El gen *MUTYH* fue identificado como causante de poliposis adenomatosa en el año 2002, en una familia con un patrón recesivo de la enfermedad en la que se observó una alta frecuencia de transversiones G:C>T:A en el ADN tumoral (Al-Tassan 2002). *MUTYH* es una glicosilasa que interviene en la ruta BER de reparación del daño oxidativo mediante el mecanismo de excisión de bases (Lu 2001). El fallo de este mecanismo de reparación deriva en la acumulación de transversiones G:C a T:A en el tejido tumoral. Tras examinar los alrededores de las áreas mutadas vieron que con frecuencia eran dominios GAA (Jones 2002).

El tejido colónico está expuesto a un alto estrés oxidativo y una de las claves del desarrollo de adenomas y de CCR en los portadores de mutaciones en *MUTYH* es la circunstancia de que el gen APC contiene 216 sitios GAA en su secuencia, lo que le confiere una especial vulnerabilidad (Babbs 1990; Cheadle 2003; Sampson 2005).

Se han descrito dos mutaciones recurrentes en *MUTYH*, Y165C y G382D, que en población caucásica representan el 80% del total de mutaciones (Sieber 2003; Lipton 2006). Estos alelos reducen considerablemente la función proteica. Se ha visto que en otros grupos étnicos hay diferentes alelos que aparecen reiteradamente aunque se desconocen sus frecuencias reales (Sampson 2005).

La frecuencia de portadores heterocigotos de una de las mutaciones recurrentes en población general varía entre el 0,3 y el 2%. Hay cierta controversia en el riesgo de cáncer en portadores heterocigotos. Se han llevado a cabo algunos estudios sin conclusiones definitivas, aunque la información parece apuntar a que podrían comportarse como alelos de baja penetrancia (Jenkins 2006) (Webb 2006; Jones 2009).

Hay muy poca información sobre el papel del gen *MUTYH* en población española. En una población del norte de España, el 14,1% de las poliposis adenomatosas estaba asociado a mutaciones bialélicas en *MUTYH* (Gomez-Fernandez 2009). A pesar de que las mutaciones bialélicas en *MUTYH* se asocian más frecuentemente con fenotipos atenuados, un pequeño porcentaje también son responsables de formas clásicas de poliposis (7%)(Sieber 2003; Segditsas 2006). En población española se han descrito cifras de 4,4% aunque la información es muy limitada (Rivera 2011).

### **6.3. Otros genes implicados en poliposis adenomatosa.**

Mutaciones en otros genes de la ruta Wnt podrían ser causa de algunos tipos de poliposis. En particular *AXIN2* y *GSK3 $\beta$* , ambas piezas clave en el complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina constituyen los dos genes candidatos más lógicos. Axin2 puede compararse con el andamio sobre el que se ensambla el complejo, cuenta con un dominio de unión a Apc y otro a  $\beta$ -catenina. Existen estudios en la literatura que apuntan a *AXIN2* como el factor limitante de la formación de dicho complejo, sometido a una estricta regulación (Huang 2009).

Se han descrito tres casos con mutaciones deletéreas en el gen *AXIN2* que, además de la poliposis colónica mostraban signos de displasia ectodérmica. Dos de los casos eran familiares, en los que se observó una penetrancia casi completa y el tercero un caso esporádico. En los tres casos hubo signos de displasia ectodérmica con prevalencia de oligodontia y una amplia variabilidad clínica, incluso intrafamiliar, tanto en el número e histología de los pólipos como en las manifestaciones de la displasia ectodérmica (Lammi 2004; Marvin 2011).

En lo que a la Gsk3- $\beta$  se refiere, es la proteína kinasa encargada de fosforilar la  $\beta$ -catenina para que el proteosoma pueda reconocerla. Esta acción constituye pues el paso final de marcaje para la degradación de la  $\beta$ -catenina. El papel real del GSK3- $\beta$  en el CCR no se conoce bien, del mismo modo su regulación es aún una incógnita.

No existen estudios publicados hasta la fecha que describan asociación alguna entre mutaciones en este gen y el desarrollo de alguna forma de poliposis. Cinco variantes descritas en este gen han sido relacionadas con ciertos trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Benedetti 2004; Kwok 2005; Lachman 2007; Schaffer 2008; Hur 2010).

Varios estudios describen la expresión de esta proteína a nivel inmunohistoquímico en tumores colorrectales (Wang 2011).



En lo que respecta a genes no pertenecientes a la vía Wnt, recientemente se ha descrito la implicación del gen *BUB1B* en un paciente que presentaba neoplasia gastrointestinal (Rio Frio 2010). El gen *BUB1B* forma parte del *Mitotic Checkpoint Complex* (MCC), esto es el complejo de proteínas que interviene en el *checkpoint* mitótico. Dicho de otro modo el gen participa en la ruta SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*), una de las principales rutas en ciclo celular. El paciente con la alteración de *BUB1B* fue diagnosticado de varios cánceres gastrointestinales primarios (ampolla de vater, adenocarcinoma de colon y varios adenocarcinomas gástricos). Durante el seguimiento, el paciente desarrolló una poliposis adenomatosa múltiple con pólipos tanto colorrectales como gástricos. Tras el estudio negativo de los genes implicados en poliposis adenomatosa y en Síndrome de Lynch, el cariotipo del paciente reveló una aneuploidía variegada en mosaico y resultó finalmente, ser portador de una mutación en homocigosis del gen *BUB1B*. En el estudio de Rio Frio *et al* (Rio Frio 2010), se demuestra la interacción de *APC* con *Bub1*, proteína codificada por *BUB1B*, y la conexión molecular entre el genotipo y el fenotipo de este paciente. Cabe destacar que el gen *APC* tiene una función primordial en la separación del huso mitótico mediante la unión al factor *Eb1*, también conocido como *Mapre1*, que a su vez forma parte de los genes SAC. El papel concreto de *BUB1B* y otros genes de la ruta SAC, en la poliposis adenomatosa está aún por determinar, pero deberían ser tenidos en cuenta de cara al diagnóstico genético en pacientes con poliposis adenomatosas sin causa genética identificada. Un caso similar al anterior fue descrito por de Voer *et al* (de Voer 2011), donde una paciente portadora de una mutación en el gen *BUB1* desarrolló aneuploidía variegada en mosaico y múltiples neoplasias de colon.

## 7. Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular de la poliposis adenomatosa se basa en el cribado mutacional de los genes *APC* y *MUTYH*. Los algoritmos de trabajo dependen en primer lugar de una buena definición del fenotipo del paciente, de la historia familiar y de la posible identificación del modelo de herencia. En líneas generales, siempre que el modelo de herencia se ajuste al patrón recesivo, debería plantearse primero el estudio del gen *MUTYH*, mientras que si existe un modelo dominante, deberá plantearse el estudio de *APC*, siempre y cuando no se trate de familias con múltiple consanguinidad. La presencia de manifestaciones extracolónicas también puede orientar hacia qué gen estudiar. Cuando no hay antecedentes familiares de la enfermedad y el fenotipo es atenuado, o si existe consanguinidad, podría ser conveniente comenzar por *MUTYH*.

Si se trata de un fenotipo severo podría comenzarse el estudio del gen *APC* por los codones 1309 y 1061, seguido del resto de la región MCR. En las siguientes fases se

completaría el estudio del exón 15 y de la mitad 5' del gen, donde aparecen la mayoría de las mutaciones (Bertario 2003). Respecto a los grandes reordenamientos, se ha descrito que pueden representar hasta el 8-12% de todos los casos (Aretz 2005; Nielsen 2007).

También conviene tener presente que los fenotipos atenuados se relacionan con mutaciones en los extremos 5' y 3' del gen así como a la región de procesamiento alternativo del intrón 9, aunque mutaciones en estas regiones también pueden verse en formas clásicas de la enfermedad (Knudsen 2003; Rivera 2011).

Por su parte el estudio en el gen *MUTYH* se centra básicamente en el análisis en primera instancia de las mutaciones recurrentes en nuestra población. Además de las mencionadas Y165C y G382D, se suele realizar el estudio de otras mutaciones, como la c.1186\_1187insGG; p.E396fsX437 en el codón 1186, o las mutaciones *missense* c.692G>A y c.462G>A, y la delección c.1395\_1397delGGA, que también han aparecido en repetidas ocasiones en nuestra población. Cuando se detecta una mutación recurrente, se deberá realizar el estudio del gen completo. Igualmente, también es conveniente completar el estudio del gen cuando no se detecta ninguna mutación recurrente pero la historia clínica es muy sugerente de la implicación de *MUTYH*.

## 8. Correlación genotipo- fenotipo

Durante los últimos años varios estudios han buscado una correlación entre la localización de la mutación y el fenotipo desarrollado por los pacientes (revisado en detalle por Nieuwenhuis y Vasen(Nieuwenhuis 2007)). Esta información puede tener un importante interés clínico ya que contribuye a mejorar el consejo genético y hace más ágil el análisis mutacional. Sin embargo, es posible que la información actualmente disponible no tenga una aplicación universal y su validez quede restringida a algunas poblaciones, aquellas de las que proceden los datos.

Una de las asociaciones más ampliamente aceptadas es aquella entre las mutaciones en la región MCR, en concreto en el codón 1309, con los fenotipos más severos, caracterizados por la presencia de más de un millar de pólipos, y con un debut de la enfermedad en torno a 10 años antes de lo que cabría esperar (Caspari 1994; Ficari 2000). Otra de las asociaciones clásicas es la que relaciona mutaciones en los extremos 5' y 3' del gen con el desarrollo de un fenotipo atenuado, concretamente aquellas mutaciones anteriores al codón 157 y posteriores al 1517 (Knudsen 2003; Half 2009). En el extremo 5' este efecto se explicaría por la presencia de un segundo sitio de inicio de transcripción en el codón 184 que en parte solventaría el efecto de una mutación anterior a esa zona (Heppner Goss 2002). La región

de procesamiento alternativo del exón 9 se ha asociado también a fenotipos PAFA (Knudsen 2003).

No obstante, esta información podría no ser aplicable en la población española. Son necesarios estudios con series amplias de familias para conocer si son válidas estas asociaciones.

### **9. Importancia de las manifestaciones extracolónicas en el diagnóstico clínico.**

La presencia de una manifestación extracolónica en el paciente unido a la severidad del síndrome puede orientar el diagnóstico hacia la búsqueda de mutaciones en un gen determinado. Por ejemplo, podríamos iniciar el estudio por *MUTYH* cuando aparecen pilomatricomas o quistes epidermoides (Baglioni 2005), incluso plantear la posibilidad de un Síndrome de Lynch (Muir Torre). Mientras que en los casos donde se observe poliposis, tumor desmoide u osteoma estaríamos frente a una posible FAP clásica con mutaciones en *APC*. Además, aunque puntualmente se han descrito en PAAM, los tumores desmoides y los osteomas, son manifestaciones infrecuentes en esa entidad (Sieber 2003). También la presencia de cáncer de mama o de endometrio, en el paciente o en la familia, podría orientar hacia el estudio de *MUTYH*, ya que ambas neoplasias que no se considera como una manifestación extracolónica en la FAP clásica (Nielsen 2005; Barnetson 2007; Tricarico 2009). Pólipos serrados e hiperplásicos también pueden asociarse a mutaciones en *MUTYH* (Boparai 2008).

### **10. Familias con Poliposis Adenomatosa y estudio genético negativo**

En un 15-20% de los casos con fenotipo clásico y hasta en el 70% de los casos con atenuado, no se detectan mutaciones ni en *APC* ni en *MUTYH*. Estos casos plantean un problema para el consejo genético y el manejo de las familias. Cabe pensar que alguno de estos casos podrían ser falsos negativos, que realmente presenten mutaciones en alguno de los dos genes conocidos que las técnicas actuales no permiten detectar. Alternativamente, mutaciones en genes diferentes de *APC* y *MUTYH*, aún no identificados, podrían ser responsables de algunos otros casos. Esta última circunstancia podría explicar las diferencias clínicas entre las familias con y sin mutación detectable en *APC* o *MUTYH* observados en algunos estudios (Renkonen 2005; Rivera 2011). Sea como sea, en estos casos de PAF o PAAM con estudio genético negativo, conviene ofrecer a los miembros familiares a riesgo,

las medidas de seguimiento consensuadas para las familias positivas y que se mencionarán más adelante.

En el presente trabajo nos proponemos profundizar en estas familias con estudio genético negativo, intentando descartar la participación de los genes clásicamente implicados, *APC* y *MUTYH*, y buscar otros genes que puedan explicar estas formas de poliposis.

Este trabajo se enmarca dentro de un amplio estudio con un importante número de familias con PAF procedentes de diversos puntos del país.



---



**BJETIVOS**





**Objetivos:**

- 1- Caracterización clínica y estudio genético de una serie de familias españolas con una forma clásica de Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF).
- 2- Análisis de la correlación genotipo-fenotipo en la serie de familias españolas con PAF.
- 3- Estudio de las bases genéticas de las familias *APC/MUTYH* negativas afectas de PAF clásica
- 4- Caracterización molecular de los pólipos adenomatosos de pacientes *APC/MUTYH* negativos y su comparación con los perfiles de expresión inmunohistoquímica de pólipos de pacientes *APC* y *MUTYH* positivos, oligopoliposis y pólipos esporádicos.

---



ATERIALES  
Y  
ÉTODOS



## PACIENTES Y DATOS CLÍNICOS.

Los pacientes con una sospecha clínica de FAP fueron evaluados en una unidad de consejo genético, y se llevó a cabo el estudio molecular en dos centros españoles, Institut Català d'Oncologia (ICO) y Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). En todos los casos se recogió la historia clínica de todos los miembros afectos y un árbol familiar detallado. En el Anexo I se recoge un modelo de cuestionario clínico, consentimiento informado para los pacientes y los árboles de las familias incluidas en el estudio. El caso índice o *probando* fue considerado el primer miembro que asistió a la consulta de consejo genético. En la gran mayoría de los casos los probandos estaban afectos. Los estudios realizados fueron aprobados por un Comité Ético en los hospitales de procedencia. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado específico para este proyecto.

## I. EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN.

**I.1. Extracción de ADN de sangre periférica:** Se obtuvo ADN de una muestra de linfocitos de sangre periférica mediante un procedimiento automático usando el *MagNA PURE LC Instrument procedure* (Roche), siguiendo el protocolo del fabricante.

**I.2. Extracción de ARN total** se llevó a cabo a partir de 7ml de sangre total siguiendo el protocolo detallado a continuación:

1-Rotular tubos Falcon de plástico estériles

2-Dispensar 9 ml de FICOL-HISTOPAQUE en los tubos y sobre el ficol echar lentamente 7ml de sangre periférica con una pipeta Pasteur dejando resbalar la sangre poco a poco sobre la pared del tubo evitando así su mezcla con el ficol.

3-Centrifugar 30 min a 2700 rpm a 20°C (seleccionar el programa de acelerado y frenado lento)

4-Separar la capa de linfocitos:

a. Recoger con cuidado la fase intermedia (nube de leucocitos) con una pipeta Pasteur de cristal en otro Falcon rotulado y estéril de 15ml. Llenar el Falcon con PBS1x+0.1%DEPC. Agitar suavemente y centrifugar 10 min a 3000 rpm a TA.

b. Decantar el sobrenadante, resuspender el *pellet* con 1.5 ml de PBS1x+0.1%DEPC y transferirlo a un *eppendorf* de 2 ml para un segundo lavado; llenar el *eppendorf* hasta arriba. Agitar suavemente y centrifugar 10 min a 14000 rpm a 4°C.

c. Decantar el sobrenadante, añadir 1,5ml de TRI-REAGENT y homogeneizar bien la mezcla con la punta de la pipeta hasta deshacer por completo los agregados que se formen.

d. Incubar 15 min a TA o a -20°C toda la noche.

e. Añadir 300 ul de cloroformo y agitar vigorosamente en el vortex

f. Incubar 15 min a TA

g. Centrifugar 15 min a 14000 rpm a TA.

#### 5. Precipitación del ARN

- a. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio
- b. Añadir 750 µl de Isopropanol e incubar 10 min a TA o toda la noche a -20°C
- c. Centrifugar 8 min a 14000 rpm a 4-25°C y decantar el sobrenadante

#### 6. Lavado y solubilización del ARN

- a. Añadir 1 ml de etanol al 75% y agitar mediante vortex
- b. Centrifugar 5 min a 14000 rpm a 4°C y decantar el sobrenadante
- c. Dejar evaporar las trazas de etanol a TA durante 3-5 min. Es muy importante no secar completamente el *pellet* para no disminuir mucho su solubilidad.
- d. Resuspender en 50/100 µl de agua-DEPC 0,1% según la cantidad de precipitado
- e. Incubar y mantener en hielo si se van a procesar inmediatamente o congelar a -20°C y posteriormente a -80°C.

La concentración de ARN total se midió usando el *nanodrop* y analizando su integridad en un gel de agarosa al 1% previa desnaturalización en formamida.

### 1.3. Retro-transcripción de ARN a cADN

La retrotranscripción de ARN a ADN copia se llevó a cabo utilizando la enzima *Superscript II Reverse Transcriptase* de la casa comercial *Invitrogen*. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Partimos de 500ng de ARN total en un tubo *ependorf* estéril y libre de nucleasas
2. Añadimos 1 µl de *primers* universales a 500 ng/µl y 1 µl dNTP Mix (10 mM de cada desoxirribonucleótido)
3. Añadir agua estéril y destilada hasta 12 µl
4. Incubar la mezcla a 65°C durante 5min y enfriar posteriormente hasta 4°C
5. Añadir:
  - 4 µl del tampón de síntesis de cADN 5x *First-Strand Buffer*
  - 2 µl de DTT 0.1 M
  - 1 µl de ARNseOUT (40 unidades/µl) de la casa comercial *Invitrogen*.
6. Mezclar en el tubo e incubar a 25°C durante 2min
7. Añadir 1 µl (200 unidades) de *Superscript II Reverse Transcriptase* y mezclar pipeteando arriba y abajo en el tubo.
8. Incubar a 25°C durante 10min
9. Incubar a 42°C durante 50min
10. Inactivar la reacción mediante una incubación a 70°C de 15min de duración.

### 1.4. Extracción de ADN de tejido parafinado

Para la extracción de ADN de material parafinado se utilizó el kit “*DNAse Tissue Kit*” (*Qiagen, Chatswoth, CA, USA*) con algunas modificaciones, el cual se detalla brevemente a continuación:

1. Colocar en un *eppendorf* 4 cortes de 10  $\mu\text{m}$  del tumor y añadir 800  $\mu\text{l}$  de xilol seguido de agitación fuerte para disolver la parafina.
2. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min a TA.
3. Desechar sobrenadante.
4. Repetir paso 2.
5. Añadir 1200  $\mu\text{l}$  de etanol 100%, seguido de agitación fuerte.
6. Repetir paso 2.
7. Repetir paso 5.
8. Repetir paso 2.
9. Dejar secar el *pellet* entre 10-15 min a 37°C o a TA.
10. Resuspender en 180/200  $\mu\text{l}$  de tampón ATL dependiendo de la cantidad de tejido.
11. Añadir 20-40  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (20 mg/ml) dependiendo de la cantidad de tejido, agitar e incubar durante 1-3 h a 55°C con agitación de vez en cuando.
12. Añadir más proteinasa K si el tejido no se ha degradado después del tiempo previsto y dejar que la reacción actúe durante toda la noche (16 h).
13. Añadir 200/400  $\mu\text{l}$  de tampón AL dependiendo de la cantidad de tejido y mezclar inmediatamente.
14. Añadir 200/400  $\mu\text{l}$  de etanol 100% y agitar fuertemente.
15. Pipetear la mezcla en las “DNeasy” mini-columnas provistas de tubos colectores de 2 ml.
16. Centrifugar a 12000 rpm durante 1 min. Desechar sobrenadante.
17. Repetir pasos 15 y 16 si todavía queda mezcla debido a los volúmenes utilizados previamente dependientes de la cantidad de tejido.
18. Añadir a la columna 500  $\mu\text{l}$  de tampón AW1.
19. Repetir el paso 16.
20. Añadir a la columna 500  $\mu\text{l}$  de tampón AW2.
21. Centrifugar a 12000 rpm durante 3 min.
22. Diluir el ADN retenido en las mini-columnas añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de agua *Braun* a 65°C, o de tampón Tris-EDTA (TE 10:1, pH=8.0) o tampón AE (provisto por el *kit* comercial) a TA. Esperar durante 5 min a TA.
23. Centrifugar a 12000 rpm, durante 1 min. No eliminar el volumen diluido.
24. Repetir pasos 22 y 23. Se han recuperado ~200  $\mu\text{l}$  de volumen en el que está diluido el ADN tumoral.
25. Medir concentración en espectrofotómetro *Nanodrop* y correr 5  $\mu\text{l}$  en gel de agarosa al 1% para analizar tamaño del ADN.

### 1.5. Extracción de ADN de tejido congelado

Para la extracción de ADN de material parafinado se utilizó el mismo *kit* “*DNase Tissue Kit*” (*Qiagen, Chatswoth, CA, USA*) con algunas modificaciones:

1. Cortar el tejido congelado e incluido en *O.C.T. Tissue -Tek* con ayuda de un criostato
2. Colocar en un *eppendorf* 15 cortes de 10  $\mu\text{m}$  del tejido
3. Continuar con el paso 10 del protocolo detallado en el apartado anterior

## **2. ESTUDIOS MOLECULARES DE LOS GENES APC Y MUTYH Y ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.**

### **2.1. Estudios moleculares del gen APC.**

Para la búsqueda de mutaciones puntuales en el gen *APC* se utilizó la tecnología *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography* (DHPLC) y secuenciación directa. Las muestras fueron amplificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 32 fragmentos diferentes. Los *primers* utilizados para la amplificación del gen en 32 amplicones se recogen en la Tabla MI.

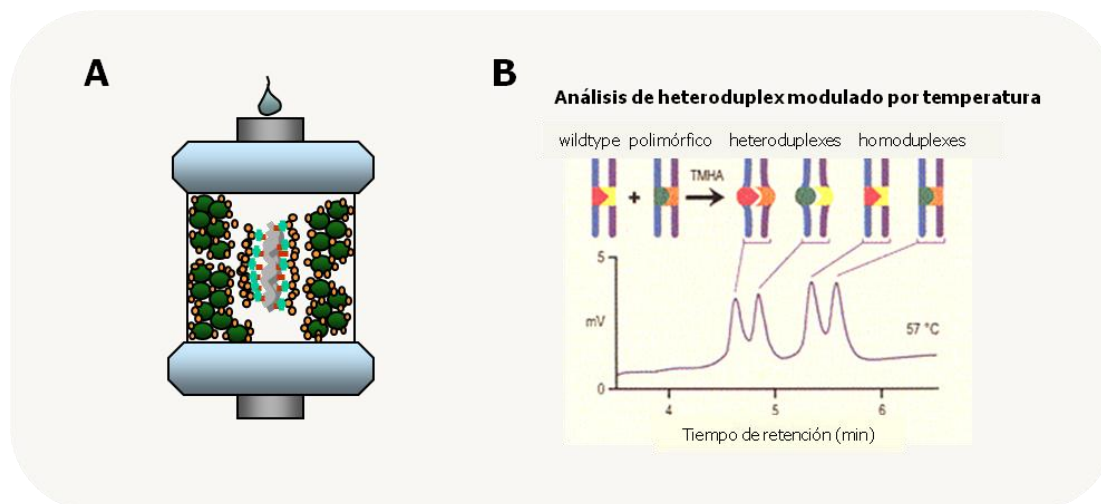
En un primer paso los amplicones heterocigotos fueron discriminados utilizando el dHPLC.

#### **2.1.1. Genotipado mediante dHPLC**

El dHPLC es un método basado en la detección de especies heteroduplex. Los heteroduplex se forman mediante la desnaturalización por calor del ADN y posterior renaturalización del mismo, lo cual produce un desemparejamiento en individuos heterocigotos. Estos heteroduplex son distinguibles de los homoduplex, formados por las dos cadenas idénticas presentes en individuos homocigotos.

El dHPLC se basa en la utilización de una columna compuesta por moléculas hidrofóbicas, que en fase reversa unirá especies de ADN mediante TEEA (triethyl-amonio-acetato). El ADN es eluido de la columna mediante la incorporación del compuesto hidrofóbico acetonitrilo, en un porcentaje de acuerdo a la longitud y composición GC del fragmento a estudiar. La adecuada temperatura de desnaturalización parcial del fragmento nos permitirá discriminar especies homoduplex de las heteroduplex por el tiempo que el fragmento esté retenido en la columna (Figura MI).





**Figura M1.** Discriminación alélica mediante DHPLC. **A.** Columna hidrofóbica. En verde, bolas hidrofóbicas; en gris, molécula de doble cadena de ADN; en naranja, TEAA (elemento de unión entre el ADN y los componentes hidrofóbicos de la columna). **B.** Esquema representativo de un cromatograma y su correspondencia con las diferentes especies (homo y heteroduplex). Los picos del cromatograma se distinguen por tiempo de retención

Posteriormente los productos de PCR se purificaron mediante ExoSap-IT (*USB Corporation, Ohio, USA*) y se secuenciaron directamente por el método *Sanger* con un secuenciador 3730 de *Applied Biosystems*.

### 2.1.2. Genotipado por secuenciación directa

Para algunas exones y determinadas muestras se empleó la secuenciación directa para la búsqueda de mutaciones. El estudio del gen *MUTYH* se realizó prácticamente en su totalidad mediante esta técnica como se explica en el siguiente apartado de estos Métodos. También se empleó la secuenciación directa como confirmación de los resultados obtenidos en otras plataformas de genotipado (dHPLC o KASpar). Se realizaron reacciones de PCR convencional, en un volumen total de 25  $\mu$ l, y empleando para la amplificación un termociclador *epgradient S* (*Eppendorf*). Para el diseño de *primers*, se utilizó el programa *Primer3* ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)).

El protocolo general de amplificación fue:

1. Desnaturalización inicial: 5 min a 94°C
2. Ciclos de desnaturalización/hibridación/elongación: 30 seg a 94°C, 30 seg a la temperatura de hibridación ( $T_h$ ) específica (ver Tabla 4), 30 seg a 72°C. Para optimizar el rendimiento de la PCR, se realizaron un total de 35 ciclos, distribuidos en 5 ciclos con una  $T_h = x + 4$ , otros 5 ciclos con una  $T_h = x + 2$  y 25 ciclos con la  $T_h$  óptima para ese fragmento.

3. Un paso final de elongación: 10 a 72°C

La Tabla MI recoge las secuencias de los *primers* y las temperaturas de hibridación utilizadas para cada PCR.

4. Antes de la secuenciación, 5 µl de los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa (*Pronadisa, España*) al 1.5% durante 20min, para comprobar la amplificación.

5. El producto de PCR se purificó, empleando el reactivo ExoSAP-ITTM (*GE Healthcare*), que contiene una mezcla de las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina. Para la purificación, se mezclaron 10 µl de producto de PCR con 4 µl del reactivo, y se incubó durante 15 min a 37°C, seguido de otros 15 min a 80°C.

6. Los amplicones purificados fueron secuenciados de forma automática utilizando terminadores fluorescentes *Big DyeTM* (*Applied Biosystems, CA, USA*) y un secuenciador multicapilar ABI modelo 3730xl (*Applied Biosystems, CA, USA*). Para el análisis de los diagramas de picos resultantes de la secuenciación, empleamos el programa *Cromes Lite*, versión 2.0, de la [www.Technelysium.com.au](http://www.Technelysium.com.au).

APC	Secuencia 5'-3'	
Exón1	Sentido	AGGTCCAAGGGTAGCCAAG
	Antisentido	TACCTCAAGTTTACAAGAGGGAAT
Exón2	Sentido	CTCAGCATACTTAAATGTCAAGAAA
	Antisentido	ACACCTAAAGATGACAATTGAG
Exón3	Sentido	TTAAGAATATTTTAGACTGCTTAAAGC
	Antisentido	ACAATAAACTGGAGTACACAAGG
Exón4	Sentido	TGATGTAAGTATTGCTCTTCTGC
	Antisentido	TGAATTTTAATGGATTACCTAGGT
Exón5	Sentido	CTTTTTTGCTTTTACTGATTAACG
	Antisentido	TGTAATTCATTTTATCCTAATAGCTC
Exón6	Sentido	GGTAGCCATAGTATGATTATTTCT
	Antisentido	CTACCTATTTTATACCCACAAAC
Exón7	Sentido	AAGAAAGCCTACACCATTTTGC
	Antisentido	GATCATTCTTAGAACCATCTTGC
Exón8	Sentido	TCATTGGAGTACCTTAACATGA
	Antisentido	ACCTGGCCAAGAATGTCTTA
Exón9	Sentido	AGTCGTAATTTGTTTCTAAACTC
	Antisentido	GCTTTGAAACATGCACTACGAT
Exón10	Sentido	AAACATCATTGCTCTTCAAATAAC
	Antisentido	TACCATGATTTAAAAATCCACCAG
Exón11	Sentido	GGGTGGAGAACTGGCATAA
	Antisentido	AGCGAATGTGAAGCACAGG
Exón12	Sentido	CATTAGTAGCCAAAAATAAAGCTTG

<b>Exón13</b>	Antisentido	ACCCCGTCTCTATAAAAAATACAAAA
	Sentido	TTTCTATTCTTACTGCTAGCATT
<b>Exón14</b>	Antisentido	ATACACAGGTAAGAAATTAGGA
	Sentido	TAGATGACCCATATTCTGTTTC
<b>Exón15.1</b>	Antisentido	CAATTAGGTCTTTTGAGAGTA
	Sentido	TGTTACTGCATACACATTGTGACC
<b>Exón15.2</b>	Antisentido	GATGAGATGCCTTGGGACTT
	Sentido	GCTCAAGCTTGCCATCTCTT
<b>Exón15.3</b>	Antisentido	GCAAACCTCGCTTTGAAGAA
	Sentido	TTCATCAAGAGGAAGCTTAGATAGTT
<b>Exón15-1061</b>	Antisentido	CTAGGTCGGCTGGGTATTGA
	Sentido	TGAAACCCTCGATTGAATCCT
<b>Exón15.4</b>	Antisentido	CCCGTGACCTGTATGGAGAA
	Sentido	CCTCAAGTTCCAACCACATTT
<b>Exón15-1309</b>	Antisentido	GAGCTGATTCTGCCTCTTGG
	Sentido	CAAAGAGTTCATCTGGACAAAGC
<b>Exón15.5</b>	Antisentido	GCCTGGCTGATTCTGAAGAT
	Sentido	CCCTAGAACCAAATCCAGCA
<b>Exón15-1462</b>	Antisentido	AGCATCTGGAAGAACCTGGA
	Sentido	CATGCCACCAAGCAGAAGTA
<b>Exón15.6</b>	Antisentido	TTGCCACAGGTGGAGGTAAT
	Sentido	CAGCCCAGACTGCTTCAAA
<b>Exón15.7</b>	Antisentido	TGATTTTGTGGGTGCAGA
	Sentido	AGTCACAAGCCTTTCCGTGT
<b>Exón15.8</b>	Antisentido	GCTGATTGTTGGTTGGAGGT
	Sentido	AGTCACAAGCCTTTCCGTGT
	Antisentido	GCTGATTGTTGGTTGGAGGT

**Tabla MI.** Secuencia de los *primers* empleados en la amplificación del gen *APC*

## 2.2. Estudio molecular del gen *MUTYH*:

El estudio molecular del gen *MUTYH* se realizó en 2 pasos secuenciales:

Primero se realiza el análisis de las mutaciones recurrentes descritas en población caucasiana (Y165C y G382D) que pueden explicar hasta un 82% de las mutaciones encontradas en este gen (Lipton 2006), mediante PCR y secuenciación directa, previa purificación de los productos de PCR con *EXOSAP-it*.

Dada la herencia recesiva asociada a este gen, cuando una de las dos mutaciones se detecta en un paciente, se completaba el estudio del resto del gen. Así mismo, en los casos esporádicos o casos únicos en una familia el estudio del gen *MUTYH* se realiza completo. Los *primers* utilizados para la amplificación del gen *MUTYH* se detallan en la Tabla M2.

<b><i>MUTYH</i></b>		<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b>Exón1</b>	Sentido	<b>TGAAGGCTACCTCTGGAAG</b>
	Antisentido	AACGGAAGTTCGACCCATC
<b>Exón2</b>	Sentido	<b>GAGTGCTTGAGAGAAGCTGGA</b>
	Antisentido	CCTGAATCTGCCTTTCATGG
<b>Exónes3-4</b>	Sentido	<b>GGGATGATTGCTGAGTGTC</b>
	Antisentido	ACTGCTGACCTGCCCTAC
<b>Exón5-6</b>	Sentido	<b>CAGTGTCTCATGCCAACC</b>
	Antisentido	CCTGTGGGTAGGATCAGAGG
<b>Exón7</b>	Sentido	<b>CTTCCCTGGAGGTGAGAGC</b>
	Antisentido	CAGGGTCTCTGCTGTACGTG
<b>Exón8</b>	Sentido	<b>GATGGCAGGAGGGTAGGAA</b>
	Antisentido	AGAGGGGCCAAAGAGTTAGC
<b>Exón9</b>	Sentido	<b>TGGCCAGGTGATCTCACAG</b>
	Antisentido	ATGGCTGCTTGGTTGAAATC
<b>Exónes10-11</b>	Sentido	<b>GGTAACAAGGGTGCTTCAGG</b>
	Antisentido	AGGGGCCAACCTAGAGAGTG
<b>Exón12</b>	Sentido	<b>AAGCCCCATTCCAGTTCTTC</b>
	Antisentido	CCGATTCCCTCCATTCTCTC
<b>Exón13</b>	Sentido	<b>AGGGCAGTGGCATGAGTAAC</b>
	Antisentido	AAGGTGTGGACAACCTGGAG
<b>Exón14</b>	Sentido	<b>CGGAATAGCCAAGGATGTTG</b>
	Antisentido	AGCGATTCTCCGTCTCAAAA
<b>Exón15</b>	Sentido	<b>TGAAGTTAAGGGCAGAACACC</b>
	Antisentido	ATGGAAGGTCTCCAGGTCAA
<b>Exón16</b>	Sentido	<b>GGGAAAGGGAGAGAGGACAA</b>
	Antisentido	CACTTGAGGCCAGAATCACC

**Tabla M2.** Secuencia de los *primers* empleados en la amplificación del gen *MUTYH*

Las mutaciones en los genes *APC* o *MUTYH* se clasificaron como deletéreas si cumplían los siguientes requisitos:

- a) aparecían como patogénicas en la base de datos HGMD
- b) producían un codón de parada prematuro y el consiguiente truncamiento de la proteína.

Una vez que se identificaba una mutación en una familia, se ofrecía consejo genético y la posibilidad de un estudio molecular a los familiares.

### 2.3. Análisis de grandes deleciones genómicas

El estudio de los grandes reordenamientos de los genes *APC* y *MUTYH* se llevó a cabo usando la técnica de amplificación por PCR *multiplex* dependiente de ligación (*MLPA-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (*SALSA P043 APC exon deletion test kit, MRC-Holland*), siguiendo el protocolo del fabricante o mediante la tecnología *QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescence fragments)*, de acuerdo a las condiciones descritas por Castellsagué et al (Castellsague 2008).

El estudio de grandes reordenamientos del gen *APC* se hizo por duplicado. En un primer paso se estudiaron las muestras con el *SALSA P043- APC*, nombre con el que se denomina la forma comercial de *MLPA* para el estudio completo de los exones del gen *APC* (*MRC-Holland, Ámsterdam, Holanda*) o con *QMPSF*. Posteriormente se repitió el estudio de grandes reordenamientos utilizando el nuevo *kit* comercial *P043-C1 APC* que contiene 38 sondas en total más 7 sondas específicas control de calidad y cuantificación de la muestra. Entre las 38 sondas se encuentran sondas para cada uno de los exones de *APC* y dos sondas que incluyen regiones del promotor 1B del gen. Además se incluyen 3 sondas para el gen *MUTYH*. En la mezcla de sondas se incluyen también sondas referencia para otros genes humanos localizados en distintos cromosomas que se utilizan como controles (Tabla S1 del material suplementario). Para el estudio de grandes reordenamientos de *MUTYH* se utilizó el *kit* comercial *Salsa MLPA p378-A2 MUTYH* que incluye una mezcla de 26 sondas correspondientes a controles de calidad, los exones del gen *MUTYH* y cromosomas control de humanos.

El protocolo que se aplica es el recomendado por el fabricante con ligeras modificaciones:

#### Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas:

1. Diluir el ADN con TE hasta un volumen de 5 µl por muestra. La cantidad de ADN para cada reacción oscila entre 20 y 500 ng (recomendado 100 ng).
2. Calentar durante 5 min a 98°C y atemperar a 25°C.
3. Agitar la mezcla de sondas mediante un vortex

## 4. Añadir:

- 1,5 µl de la mezcla de sondas SALSA
- 1,5 µl del tampón de SALSA

5. Mezclar e incubar durante 1 min a 95°C y 16 h a 60°C.

**Reacción de ligación:**

6. Agitar los tampones mediante un vortex

- Preparar en hielo la mezcla de ligación:
  - 3 µl de Tampón A de la Ligasa 65.
  - 3 µl de Tampón B de la Ligasa 65.
  - 25 µl de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.
  - 1 µl de Ligasa 65.

7. Antes de añadir la mezcla de ligación, reducir la temperatura del termociclador hasta 54°C y a esta temperatura, añadir 32 µl de la mezcla a cada muestra.

8. Incubar durante 10-15 min a 54°C y 5 min a 98°C

**Reacción de PCR:**

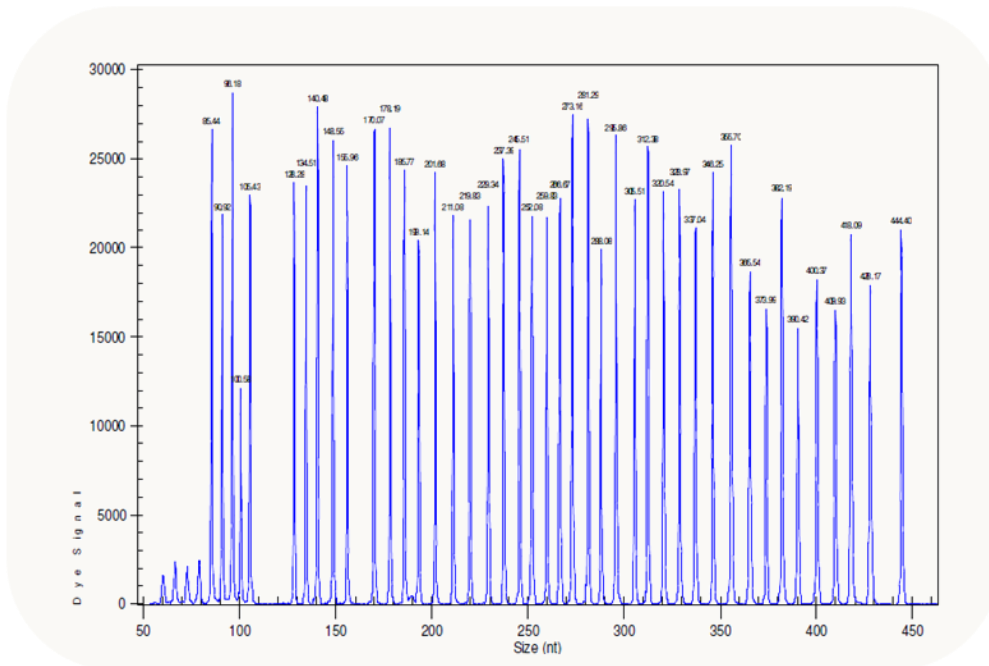
- Preparar la mezcla de PCR:
  - 2 µl de *primers SALSA*:
    - Sentido: 5' - \*GGGTTCCCTAAGGGTTGGA - 3'
    - Antisentido: 5' - GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA - 3'
    - \*Marcado con fluorocromo.
  - 2 µl de tampón de dilución de enzima.
  - 5'5 µl de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.
  - 0'5 µl de ADN *Taq* Polimerasa SALSA.
- En tubos de 0'2µl nuevos añadir:
  - 4 µl de tampón SALSA de PCR 10X.
  - 26 µl de H<sub>2</sub>O destilada y estéril.
  - 10 µl de la reacción de ligación.
- Poner los tubos en el termociclador a 60°C y cuando estén a esta temperatura, añadir 10 µl de la mezcla de PCR a cada uno.
- Comenzar la reacción de PCR bajo las siguientes condiciones:
 

95°C.....30seg	}	33 ciclos
60°C.....30seg		
72°C.....60seg		
72°C.....20min		
- Cargar 6 µl de producto de PCR en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio o GelRED y visualizar directamente bajo luz UV (*GelDoc 2.000, Bio-Rad*).

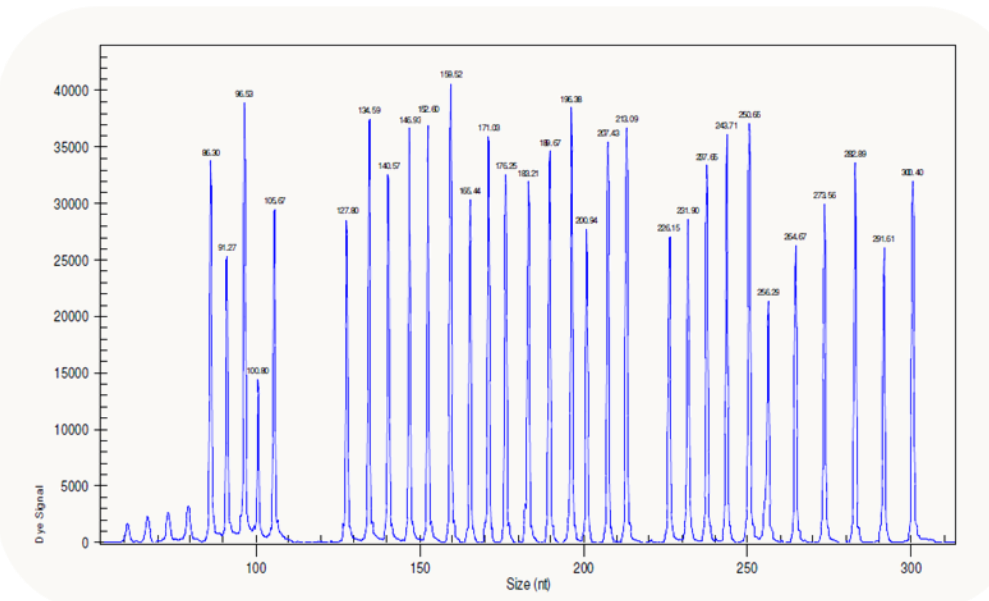
### 2.3.1. Visualización:

Preparar para cada muestra: 12  $\mu$ l de formamida desionizada; 0,1  $\mu$ l del marcador de tamaño marcado con *TAMRA* (*TAMRA 500*) y 1  $\mu$ l del producto de PCR. Esta mezcla se analiza en un secuenciador *ABI Prism 3700* (*PE Applied Biosystems*) y se visualizan los resultados mediante el software *GeneScan 3.5* (Figura M2).

a)



b)



**Figura M2.** Visualización mediante *GeneScan 3.5* de grandes reordenamientos estudiados mediante MLPA. a) diagrama de *SALSA MLPA kit P-0043-C1 APC*. b) diagrama de *SALSA MLPA kit P-378-A2 MLPA MUTYH*.

## 2.4. Análisis de las características clínicas de los distintos grupos de pacientes según su genotipo

Una vez clasificados los pacientes en portadores de mutaciones en *APC*, en *MUTYH*, o pacientes *APC/MUTYH*-negativos, se analizó su historia familiar para comparar las características clínicas más importantes entre estos tres grupos. Se valoraron:

- Los antecedentes familiares del síndrome
- Edad de debut de la enfermedad
- Presencia de manifestaciones extracolónicas
- Desarrollo de neoplasias extracolónicas.

Debido al escaso número de pacientes portadores de mutaciones en *MUTYH* no se incluyeron en los análisis estadísticos. Con el propósito de evitar sesgos proporcionados por el seguimiento en pacientes con antecedentes familiares de FAP, el análisis del debut del síndrome se realizó incluyendo sólo aquellos casos esporádicos en ambos grupos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *SPSS 2.0.* y el programa *R* aplicando *chi-cuadrado* o *test exacto de Fisher*, según requerimientos, para analizar variables categóricas. La *t de Student* se usó para analizar variables continuas comparando los casos *APC*-positivos y los casos *APC/MUTYH*- negativos.

## 3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN ALÉLICA DIFERENCIAL EN EL GEN *APC*

En los casos negativos para el estudio de mutaciones en *APC* y *MUTYH* en los que disponíamos de ARN se procedió a estudiar la expresión diferencial en mARN del gen *APC*. Para este estudio se utilizó la tecnología de *SNaPshot system (Applied Biosystems)* para ello, se amplificó el exón II de *APC* y se midió la expresión alélica diferencial del polimorfismo rs2229992 p.Y486Y.

### 3.1. Genotipado de muestras

Las muestras de los pacientes y controles incluidos en este estudio se genotiparon para el polimorfismo rs2229992 mediante secuenciación directa del exón II de *APC*. Aquellos casos heterocigotos para el polimorfismo (11 casos y 49 controles) fueron estudiados mediante *SNaPshot*.



### 3.2. *SNaPshot*-Análisis de ADN genómico:

El ADN genómico fue amplificado según las condiciones descritas en Castellsagué *et al* (Castellsague 2009) utilizando los *primers*: sentido 5'-GGGACTACAGGCCATTGCA-3' y antisense 5'- CAAGTTTGTCAAAGCCATTCCAGC-3'. Para eliminar los *primers* no incorporados se purificaron los productos de PCR con *EXOSAP-it*. Una posterior extensión de una única base se llevó a cabo con el *SNaPshot Multiplex Kit* (*Applied Biosystem*) con el *primer* 5'-ATTGCAAGTGGACTGTGAAATGTA-3' de acuerdo al protocolo del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un total de 10ul que contenían un total de 1,5 ul de producto de PCR purificado, 4,5 ul de *SNaPshot Ready Reaction Mix* y 0,2 umol/L de *primer* de extensión. Las condiciones de extensión para el termociclador son: 25 ciclos a 96°C durante 10 seg, 50°C durante 5 seg y 60°C durante 30 seg. Los productos obtenidos se purificaron con 1 U de *shrimp alkaline phosphatase* (*Usb*) durante 60 min a 37°C y 15 min a 75°C. Las extensiones se realizaron por duplicado para calcular valores medios.

### 3.3. Medida de desbalance alélico: *SNaPshot* en cADN.

El ARN total fue extraído de sangre periférica como se describe en el apartado 1.2. Posteriormente, 500ng fueron retrotranscritos en una RT-PCR como se describe en el apartado 1.3. El cADN obtenido se amplificó específicamente usando el *primer* sense para amplificar ADN genómico y un *primer* antisentido complementario a la unión exón11-exón12 (5'-ATAGAGCATAGCGTAGCCTTGTTG-3'). Las condiciones de amplificación de cADN se extrajeron de Castellsagué *et al* (Castellsague 2009), y el procedimiento posterior fue el mismo que con ADN genómico.

Se realizaron dos RT-PCR distintas y se amplificaron los cADNs en dos productos de PCR diferentes. Así mismo estos dos productos de PCR se extendieron por separado para obtener cuatro valores de ASE (*Allelic Specific Expresion*) y calcular el valor medio.

Los productos de *SNaPshot* fueron analizados con posterioridad por electroforesis capilar en un *ABI3730 DNA analyzer* (*Applied Biosystems*). El análisis de los resultados se llevó a cabo con *Peak Scanner 1.0 software* (*Applied Biosystems*). El ASE se mide mediante una *ratio* de intensidad de los picos obtenidos en las muestras heterocigotas normalizando la *ratio* con el obtenido en ADN genómico. Las fórmulas utilizadas para el cálculo fueron:

cADN (área del pico del alelo común/ área del pico del alelo raro) dividido por el gADN (área del pico del alelo común/ área del pico del alelo raro), según está descrito en Valle *et al* (Valle 2008).

Para establecer los puntos de corte y el rango de los valores de ASE en una población normal para el gen *APC* se analizaron 49 controles sanos heterocigotos para el rs2229992.

#### 4. Estudios del Promotor de *APC*:

##### 4.1. Análisis mutacional de los promotores IA y IB del gen *APC*

La búsqueda de mutaciones en los promotores del gen se realizó por secuenciación directa mediante amplificación por PCR de cuatro amplicones distintos conteniendo la secuencia consenso de los promotores IA y IB publicada en *Esembl*.

Los *primers* utilizados para la amplificación se describen en la Tabla M3. Los productos de PCR fueron purificados mediante *EXOSAP-it* y analizados en un secuenciador 3730 de *Applied Biosystems*.

<i>APC</i> Promotores		Secuencia 5'-3'
Promotor 1A-1	Sentido	GGATTTTGCCTTCAACCTCA
	Antisentido	GCAGGGCAGAAGGATTAGCAC
Promotor 1A-2	Sentido	GCGTGTCAACTGCCATCA
	Antisentido	TAAGACAGTGCGAGGGAAA
Promotor 1B-1	Sentido	CGGAAACCCAAMTGATATTGT
	Antisentido	GCCATCTTGTTGGGAGGTG
Promotor 1B-2	Sentido	AAGCCASCAACACCTCTCAC
	Antisentido	CGGGAGGAGACGTCAATG

**Tabla M3.** Secuencia de los *primers* empleados en la amplificación de los promotores IA y IB del gen *APC*

##### 4.2. Análisis de metilación germinal de los promotores del gen *APC*

En aquellos casos en los que se obtuvieron valores de ASE positivos o limitantes en los puntos de corte se analizó el estado de metilación de los promotores IA y IB del gen.

Para las distintas partes del estudio se emplearon modificaciones de protocolos previamente descritos (Herman 1996; Suter 2004).

##### 4.2.1. Modificación con bisulfito sódico:

El tratamiento del DNA con bisulfito provoca la desaminación de las citosinas (C) no metiladas generando así uracilos (U). Esta reacción no puede darse en aquellas citosinas que están metiladas (5-metilcitosina) (Wang 1980). Este ADN modificado puede ser amplificado

y secuenciado, proporcionando así información detallada, dentro de la región amplificada, del estado de metilación de todas las islas CpG. Para la modificación por bisulfito utilizamos el kit comercial EZ DNA Methylation-Gold Kit de la casa ZYMO RESEARCH según el protocolo del fabricante disponible en la página: [www.zymoresearch.com](http://www.zymoresearch.com)

Para realizar este estudio se utilizó ADN genómico procedente de nuestras muestras problema y una serie de controles por duplicado detallados a continuación:

- Control de linfocitos de un individuo sano modificado por bisulfito: LN-BMOD
- Control de metilación ADN comercial metilado (*CpGenome* de la casa comercial *Millipore* ) modificado por bisulfito: IVD-BMOD
- Control de linfocitos de un individuo sano no modificado por bisulfito: LN-NMOD
- Control de metilación ADN comercial metilado no modificado por bisulfito: IVD-NMOD

#### 4.2.2. Amplificación de los promotores del gen APC en DNA modificado por bisulfito.

Posteriormente se realizó una amplificación de las muestras modificadas utilizando los *primers* descritos por Romero-Giménez *et al.* (Romero-Gimenez 2008) según sus condiciones y detallados en la Tabla M4 diseñados específicamente en base a la secuencia modificada:

En la PCR se incluyeron nuestras muestras problema, los cuatro controles y un control de experimento que corresponde a una muestra metilada previamente modificado con bisulfito y confirmado mediante secuenciación.

APC promotores-Metilación.		Secuencia 5'-3'
Promotor 1A-1	Sentido	GGGTTAGGGTTAGGTAGGTTGT
	Antisentido	ACACCTCCATTCTATCTCCAATAAC
Promotor 1B-1	Sentido	AGGTTAGTAAGTGTGTAATTGAGATT
	Antisentido	AAATATTACTAACTCCCACAACCC

**Tabla M4:** Secuencia de los *primers* utilizados para el estudio de metilación germinal de los promotores del gen APC

Los productos de la PCR se sometieron a una segunda reamplificación para conseguir la mayor cantidad de producto posible.

El producto de la PCR se cargó en un gel de agarosa al 1% utilizando una agarosa de bajo punto de fusión *SeaKem GTG Agarose* de la casa comercial *Lonza*. Posteriormente a la electroforesis se realiza la visualización en una lámpara de luz UV y se procede a la recuperación del ADN mediante extracción de banda con el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit Protocol* de *Quiagen* según el protocolo del proveedor.

#### 4.2.3. Clonación del ADN modificado y transformación de bacterias.

Una vez purificado y eluido el ADN se mide su concentración para la posterior ligación con el vector comercial *pGEM-T* de la casa comercial *Promega*.

El ratio óptimo de concentración entre el ADN muestra y el vector es de 3/1. Los cálculos se detallan en la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \text{inserto / vector ratio molar} = \text{ng del inserto}$$

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times 0.229 \text{ kb inserto}}{3.0 \text{ kb vector}} \times 3/1 = 11,45 \text{ ng de cada muestra}$$

La mezcla del ADN muestra y el vector para la ligación de los mismos se incubó 1h a TA y posteriormente toda la noche a 4°C. Además de las ligaciones de nuestras muestras problema se incluyeron dos controles, un control positivo de ligación y un control con el vector vacío como control de fondo.

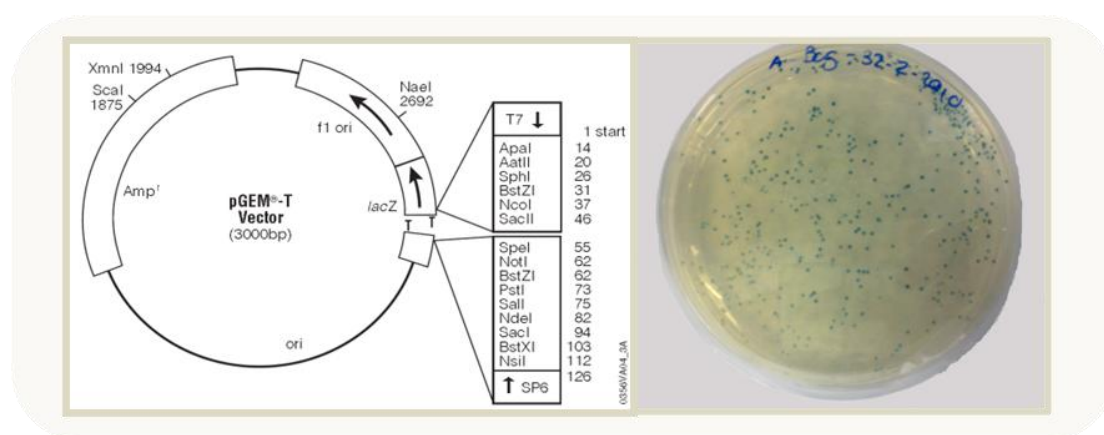
Para la transformación de bacterias se utilizaron 50ul de bacterias en cada muestra que se mezclan con 5ul del producto de la ligación y se incubó 10min en hielo antes de darle un choque térmico de 45 seg a 42°C. Posteriormente se enfría la muestra en hielo durante 2 min y se procede a una incubación de 1h a 37°C en agitación lenta con 900ul de *shock medium*.

Tras una centrifugación corta se resuspende el pellet en 200ul de *shock medium* fresco. De estos 200ul vamos a sembrar 100ul por duplicado en cada placa de medio LB+ampicilina previamente preparadas con 100ul de IPTG (100mM) y 20 ul de X-Gal (50mg/ml) e incubadas 30 min a 37°C.

#### 4.2.4. Visualización de colonias y crecimiento de bacterias en medio líquido.

Las placas ya sembradas con las bacterias se incuban a 37°C durante toda la noche. Para la visualización de colonias nos ayudamos del suplemento X-Gal e IPTG que hemos añadido a las placas. Aquellas colonias que aparezcan blancas son las colonias en las que la ligación-clonación ha sido exitosa ya que el inserto se produce en medio del operón Lac, la bacteria no puede digerir el X-gal. El color azul por el contrario nos lo proporciona el IPTG cuando la ligación no ha tenido efecto.

Se picaron 10 colonias blancas de cada placa con ayuda de una punta estéril y se ponen a crecer en medio LB líquido. Pipeteamos 5 ml de medio LB con ampicilina en tubos Falcon de 50ml, en cada uno se introduce la punta de plástico con la colonia, se cubre con parafilm y se hacen 3 agujeros para permitir la entrada de aire; en un agitador se incuban los tubos a 220 rpm y 37°C durante la noche.



**Figura M3.** Esquema del vector pGEM-T y foto de una de las placas utilizada como control de fondo en la que se siembra el vector vacío

#### 4.2.5. Minipreps y secuenciación.

El último paso consiste en la extracción del ADN de los clones y la posterior secuenciación y confección del mapa de islas CpG.

Para la extracción y purificación del ADN se utilizó el *kit* comercial de la casa QUIAGEN “QIAprep Spin Miniprep kit” siguiendo el protocolo del fabricante “Plasmid DNA purification method”.

El ADN extraído se secuencia con la ayuda de los *primers* genéricos T7 en dirección sentido y SP6 en antisentido. Se confecciona el mapa de islas CpG y se comparan aquellas citosinas que no han sido convertidas a uracilos/timinas durante el proceso de modificación por

bisulfito usando los controles no metilados e IVD (control positivo de metilación) para comparar los patrones. Se considera que el promotor está metilado si en más de 5 de los 10 clones de cada individuo existe metilación parcial o total en las islas CpG.

## 5. ESTUDIOS DE SEGREGACIÓN DE MARCADORES FLANQUEANTES AL LOCUS DE APC

En los casos familiares en los que disponíamos de muestras de ADN de varios afectos procedimos a estudiar la segregación del *locus* de APC con la enfermedad. Para ellos se analizaron marcadores microsatélites que flanquean el locus del gen y publicados en bases de datos de acceso público como NCBI (*UniSTS*) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> o en publicaciones previas. Los marcadores fueron elegidos en base a su heterocigosidad con el propósito de conseguir el mayor número de marcadores informativos posible. Los marcadores elegidos por orden de distancias al gen fueron: D5s2501, D5s492, D5s1965, D5s656, D5s2001, D5s421.

Microsatélites 5q	Secuencia 5'-3'	
<b>D5s2501</b> <i>chr5:110036315-110036626</i>	Sentido*	<b>TET-TGATTACTCTGAGGAAGAAGGC</b>
	Antisentido	TTGAAATGGGCACAGAAATT
<b>D5s492</b> <i>chr5:110251880-110252080</i>	Sentido*	<b>TET-ACAAAATGTCCTATCTCACACC</b>
	Antisentido	TGGAAAGGAAAGCAGTCATA
<b>D5s1965</b> <i>chr5:111809584-111809817</i>	Sentido*	<b>TET-TGTCCCGTTGATAAAAATTACTGCG</b>
	Antisentido	GTGTCTGGGATTTCTACGCAATG
<b>D5s656</b> <i>chr5:112702941-112703127</i>	Sentido*	<b>TET-GCTAAGAAAATACGACAATAATG</b>
	Antisentido	CATAATAAACTGATGTTGACACAC
<b>D5s2001</b> <i>chr5:112794782-112795044</i>	Sentido*	<b>TET-GCCAAGATGGTCTCGATCTC</b>
	Antisentido	TCTGAACAGGTGATGGCAAC
<b>D5s421</b> <i>chr5:112854216-112854385</i>	Sentido*	<b>TET-TGGAAATAGAATCCAGGCTT</b>
	Antisentido	TCTATCGTTAACTTTATTGATTCAG

**Tabla M5:** Secuencia de los *primers* empleados en la amplificación de microsatélites flanqueantes al gen APC.

\* *Primer* marcado con fluoróforo

Los *primers* utilizados para la amplificación de los marcadores aparecen en la Tabla M5. Los *primers* sense estaban marcados con un fluoróforo TET. Los productos de PCR se analizaron en un secuenciador 3730 de *Applied Biosystems*. Con la referencia de un marcador de tamaño molecular LIZ-500 de *Applied Biosystems* y el *software* para análisis de fragmentos *Peak Scanner* se establecieron los alelos de cada marcador que portaba cada paciente. La

segregación de marcadores se realizó y se confirmó utilizando el programa *MERLIN* versión 1.1.1

## 6. ESTUDIO MUTACIONAL DEL GEN *APC* EN cADN

Con el objetivo de buscar mutaciones en el gen *APC* que hayan podido escapar al estudio mutacional en ADN genómico, o que no sea posible detectar mediante la secuenciación exónica, estudiamos mutaciones en cADN en aquellos pacientes en los que se disponía de ARN.

La extracción de ARN y su posterior retrotranscripción a cADN se llevaron a cabo mediante el protocolo descrito en el apartado 1.2 de estos Materiales y Métodos.

Para evitar la amplificación de ADN genómico y poder capturar mutaciones profundas en los intrones diseñamos *primers* que permiten amplificar diferentes exones en un mismo amplicón de modo que las uniones entre exones se puedan analizar. Las secuencias de los *primers* se recogen en la Tabla M6 junto con las condiciones de amplificación de los distintos fragmentos.

<i>APC</i> -cADN	Secuencia 5'-3'	
Segmento A	Sentido	<b>GAAATGGGGTCCAAGGGTAG</b>
	Antisentido	TTGACCGCAGTTTACTCCA
Segmento B	Sentido	<b>GGCTTCTTCTGGACAGATTGAT</b>
	Antisentido	GCGTAATACCACTCTTTTCCTTT
Segmento C	Sentido	<b>TGCTTCTTGCTGATCTTGACA</b>
	Antisentido	TGCTTCTGTTGCTTGGGACT
Segmento D	Sentido	<b>CAGCAAATCGAAAAGGACAT</b>
	Antisentido	CAACAATGAATACACCATTTCCTCA
Segmento E	Sentido	<b>CACCTCGAAGGCTGACAAGT</b>
	Antisentido	TCAGGCTGTGAGTGAATGATG
Segmento F	Sentido	<b>ATTCCCGGGGCAGTAAAG</b>
	Antisentido	CCCCCTAGTTCATTTCATTGC
Segmento G	Sentido	<b>CCAGGACAAAAATCCAATGC</b>
	Antisentido	TTTACATCTGCTCGCCAAGA
Segmento H	Sentido	<b>CTGCATGAGAGCACTTGTGG</b>
	Antisentido	TCAGTGCAATGTGCTGACAA
Segmento I	Sentido	<b>AAGACGTTGCGAGAAGTTGG</b>
	Antisentido	TTCCACAAAGTTCCACATGC

**Tabla M6.** Secuencia de los *primers* empleados en la amplificación del cADN gen *APC*.

Los productos de PCR se purificaron con *EXOSAP-it* y se analizaron mediante secuenciación automática.

## 7. ANÁLISIS DEL 3'UTR DEL GEN APC

El 3'UTR del gen *APC* fue analizado usando dHPLC y secuenciación directa. La secuencia analizada se obtuvo del *Ensembl* y se dividió en seis amplicones entrelazados. Los *primers* utilizados se detallan en la Tabla M7. Las muestras heterocigotas y los controles homocigotos detectados por el dHPLC se purificaron mediante *EXOSAP-it* y se analizaron en un secuenciador 3730 de *Applied Biosystems*.

APC-3'UTR		Secuencia 5'-3'
Segmento 1	Sentido	AGAATCCAGTGGAAACCCAAA
	Antisentido	GAAGTTGGGATGGGATGCTA
Segmento 2	Sentido	TTTTGGGAGGCACTCTTGAT
	Antisentido	GCCATCTCACCTCAAATACCA
Segmento 3	Sentido	ATTGAATGAACTATTTTACCTGAACT
	Antisentido	AAGAGGAAATTATGTGGGCCTAT
Segmento 4	Sentido	TCCACTGGAGCTCAGTAAAAG
	Antisentido	AATAAGTGTGAGTTTATTTTCCTTCAG
Segmento 5	Sentido	TCCCTGCCTGTTAAGGAAAC
	Antisentido	CAGTACAGGCATTGGAGTCAA
Segmento 6	Sentido	CCTACCTGGTGCCTTGAAAA
	Antisentido	TGGCATGCAGTAATTCAGAAA

**Tabla M7.** Secuencia de los *primers* empleados en la amplificación del 3'UTR gen *APC*.

## 8. ESTUDIO DE MUTACIONES EN LOS GENES AXIN2 y GSK3β

Para el análisis mutacional de los genes *AXIN2* y *GSK3β* partimos de ADN genómico previamente amplificado con *GenomiPhiTM*.

### 8.1. Amplificación del genoma completo mediante *GenomiPhiTM*

En algunas muestras en las que la cantidad de ADN era escasa, se llevó a cabo una amplificación del genoma completo mediante el sistema *GenomiPhiTM V2 DNA Amplification Kit* (*GE Healthcare*). El protocolo consta de los siguientes pasos:

- I. Desnaturalizar el ADN problema, mezclando, en un tubo de 0.2 ml, 1 µl del mismo con 9 µl del



tampón para la muestra, y calentándolo a 95°C durante 3 min. Enfriar en hielo.

2. Para cada muestra a amplificar, preparar una mezcla de 9 µl del Tampón de reacción y 1 µl de la mezcla de enzima. Añadirlo a cada muestra fría.

3. Incubar la mezcla a 30°C durante 2 h para que la amplificación tenga lugar.

4. Inactivar la enzima calentando la mezcla a 65°C durante 10 min.

Los productos de amplificación de todo el genoma requieren una purificación posterior, que consiste en los siguientes pasos:

1. Preparar un tampón con volúmenes iguales (1:1) de acetato sódico y EDTA, a una concentración final de 1.5 M y 250 mM, respectivamente.

2. Transferir el amplificado a un *eppendorf* de 1.5 ml, y añadir, por muestra, 20 µl de agua *Braun* y 4 µl del tampón acetato sódico EDTA

3. Añadir a cada muestra 100 µl de etanol absoluto, mezclar con un vortex durante 1 min, y centrifugar a 13000 rpm durante 30 min.

4. Descartar el sobrenadante y lavar el *pellet* de ADN con 100 µl de etanol al 70 %. Centrifugar a 13000 rpm durante 30 min.

5. Eliminar todo el etanol, dejando evaporar la muestra toda la noche.

6. Resuspender el ADN en 50 µl de agua *Braun*, agitando la muestra en un termobloque a 37°C durante 2 h, aproximadamente.

La cantidad de ADN obtenido mediante la amplificación por *GenomiPhi* se cuantificó con *nanoDrop* y se ajustó hasta obtener concentraciones de aproximadamente 60ng/ul.

## 8.2. Amplificación de los genes *AXIN2* y *GSK3β*.

Con estos amplificados realizamos el estudio de los genes *AXIN2* y *GSK3β* en un primer paso. Cuando se encontró una variante, se repitió el estudio con ADN genómico sin amplificar y se confirmó por duplicado.

El gen *AXIN2* se amplificó en 13 fragmentos mediante PCR y se analizó por secuenciación directa. Los *primers* empleados se muestran en la Tabla M8.

Para el estudio del gen *GSK3β* se amplificaron las muestras en 12 amplicones y un primer análisis se realizó mediante dHPLC y posterior secuenciación directa. Los *primers* empleados en este caso se muestran en la Tabla M9.

<b>AXIN2</b>		<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b>Exón1A</b>	Sentido	<b>CCAGACTCAGGGAAGAGC</b>
	Antisentido	GGAGAAATGCGTGGATACCT
<b>Exón1B</b>	Sentido	<b>TGTTCCGAACCTTCTGGAG</b>
	Antisentido	GTCGTGTGTGGCTATCCC
<b>Exón1C</b>	Sentido	<b>CATGAGTAATGGGGGACTCG</b>
	Antisentido	GATGCTGTGGACTTTGCAGA
<b>Exón2</b>	Sentido	<b>TACCTGGGTTTCTGGTGAGG</b>
	Antisentido	GCATCCACTCCCAAGCAAG
<b>Exón3</b>	Sentido	<b>ACATCCTCGTAAGCCTGTGG</b>
	Antisentido	TCCACCACCCATTTCTTTTC
<b>Exón4</b>	Sentido	<b>ACCTAGCCTGCTGAACGTG</b>
	Antisentido	GACGGAAGCAGGAAGAAGG
<b>Exón5</b>	Sentido	<b>TCCTTCTGACGTCTTCCCTTT</b>
	Antisentido	GACCTGGCTGGGAGACAAG
<b>Exón6</b>	Sentido	<b>TTGGGTGTGGTTCTTGGTTC</b>
	Antisentido	GCGGCAAGCGGTGTTTAC
<b>Exón7</b>	Sentido	<b>TCTGTTTTCTCTGCTCATTCC</b>
	Antisentido	GGACCCTTCACTTCCACTCA
<b>Exón8</b>	Sentido	<b>GTCTTGGTTGGGTCTCCGTA</b>
	Antisentido	AGCACTCGGCAGATCTCAGT
<b>Exón9</b>	Sentido	<b>TGCTAAACTTGTTCCATTCCA</b>
	Antisentido	TGAGCAAACAACTGAGAGCA
<b>Exón10</b>	Sentido	<b>TCAACAATGTGGAAAATGCAG</b>
	Antisentido	TTCAGGCTTTTCTTATCTCAGTCA

**Tabla M8.** Secuencia de los primers empleados en la amplificación del gen *AXIN2*

<b>GSK3B</b>		<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b>Exón1</b>	Sentido	<b>AAAAGGTGATTCGCGAAGAG</b>
	Antisentido	AGGTTTTGCCCTTTTCCATT
<b>Exón2</b>	Sentido	<b>TTGGCAGTTTTCTCTATTTAATTCC</b>
	Antisentido	CTGAACAAAAATGCGCACAA
<b>Exón3</b>	Sentido	<b>TCTTGTTCAATATGATGAATAGCTG</b>
	Antisentido	TATGAGCGGTGGGGAGATTA
<b>Exón4</b>	Sentido	<b>GACCAGTTTCTAATCTGTTTTGTTTT</b>
	Antisentido	AAGAGGCTCTCCTTGGTTCA
<b>Exón5</b>	Sentido	<b>TTGACTGCTTAAGGATTCTGATT</b>
	Antisentido	GGCTGATATTGCAAAAGGAA
<b>Exón6</b>	Sentido	<b>CATTGATACTGTGAAAGGATAGCA</b>
	Antisentido	TCCATGGAAATAAAAGTACAGATTAG
<b>Exón7</b>	Sentido	<b>TGGTCTGGTTTCCTCTTGG</b>
	Antisentido	GGGGCGTTCTTATACCCACT
<b>Exón8</b>	Sentido	<b>CAGTGAATCCAATGCCTGAA</b>
	Antisentido	CAGGAAATCAATGAGGATGAAA
<b>Exón9</b>	Sentido	<b>CCCCACACCATGGATTTC</b>
	Antisentido	TTTAGCCTCTCAAAGAAGATTTC
<b>Exón10</b>	Sentido	<b>TGTTTCTGTACATGGTGGGAAT</b>
	Antisentido	ATGTCCGTTTTTGTCTCCA
<b>Exón11</b>	Sentido	<b>ATCCGGATGCTCCTGTATTG</b>
	Antisentido	GGCTGGTCTCAAACTCCTGA
<b>Exón12</b>	Sentido	<b>CAGCCTGCAGTTGAAACAGT</b>
	Antisentido	CGTGACCAGTGTGCTGAGT

**Tabla M9.** Secuencia de los *primers* empleados en la amplificación del gen *GSK3B*.

## 9. ESTUDIO DE LAS VARIANTES ENCONTRADAS EN EL ANÁLISIS MUTACIONAL DE LOS GENES *APC*, *AXIN2* y *GSK3B*.

El primer paso para la confirmación de las variantes encontradas fue una segunda amplificación y secuenciación en ADN genómico procedente de una nueva extracción de capa de linfocitos de sangre periférica.

El estudio posterior de las variantes encontradas depende del tipo de variante y de la región del gen en la que se encuentre.

### 9.1. Mutaciones deletéreas o que afectan a las regiones de procesamiento alternativo del gen *APC*.

Las mutaciones encontradas en el extremo 3' del gen *APC* o en la secuenciación del cADN fueron todas deletéreas afectando al marco de lectura, produciendo un codón de parada o afectando a las tres primeras pares de bases de un intrón que intervienen en el procesamiento alternativo del mismo.

Su confirmación se realizó mediante amplificación del ADN genómico procedente de una extracción distinta y se consideraron mutaciones deletéreas y patogénicas si cumplían estos requisitos o bien estaban descritas en la base de datos HGMD.

En la familia I05C (Figura 8 del material suplementario) dado que el estudio de cADN en el probando produjo una forma aberrante de procesamiento del exón 4 y un cambio en el marco de lectura, el estudio de la posible variante causal se realizó en distintos pasos:

- Búsqueda de la variante causal en el intrón 3 del gen *APC* mediante secuenciación directa de las regiones cercanas al comienzo de la inserción.
- Confirmación de la variante encontrada mediante nueva amplificación
- Estudio de segregación de la variante en la familia así como estudio de segregación de la forma aberrante de procesamiento alternativo.
- Estudios predictivos del posible efecto de la variante en el procesamiento alternativo utilizando los programas *Alamud*, *NNNSplice* y *Spliceview*.
- Población control de 855 controles sanos mediante la metodología *KASPar*.
- Estudio inmunohistoquímico (IHQ) en los pólipos de la familia. IHQ para  $\beta$ -catenina y *APC*, se llevaron a cabo en la unidad de Inmunohistoquímica del CNIO. Los anticuerpos utilizados se describen en la Tabla S5 del Material suplementario.
- Estudio de LOH en pólipos del paciente. La extracción de ADN de material parafinado se explica en el apartado 9.1 de estos Materiales y Métodos. Los *primers* utilizados para la amplificación del material parafinado y estudio de LOH se detallan en la Tabla M10.

APC-LOH-Int3		Secuencia 5'-3'
Sentido		TTCAGGTAGGTTTAGGTTCAAAC
Antisentido		AAAGGGGAAAATCATCAAAGAA

**Tabla M10:** Secuencia de primers para el estudio de LOH en la familia I05C.

## 9.2. Variantes de significado desconocido encontradas en las regiones reguladoras del gen *APC*

Respecto a las variantes no descritas encontradas en el promotor IB de *APC*, se confirmaron del mismo modo, se realizaron estudios de predicción para confirmar:

- Que las variantes estaban conservadas evolutivamente, con la base de datos *Ensembl* ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/transview?db=core:transcript=ENST00000257430](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/transview?db=core:transcript=ENST00000257430))
- Que se localizaban en sitios de unión de factores de transcripción con los programas de predicción: *ComSite* y *TFsearch*.  
([http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite?rm=t\\_input\\_single](http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite?rm=t_input_single)  
<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)

Así mismo se había estudiado la expresión alélica diferencial en estas muestras. Por último se hizo una población control de pacientes sanos mediante la tecnología de genotipación *KASPar* (apartado 9.5) para la variante localizada en Chr5:112.043.263 C>T.

Para la variante localizada en el 3'UTR (Chr5:112.181.027; A>G) del gen se confirmó en una segunda muestra de ADN genómico, lamentablemente no se pudo disponer de ADN del hermano afecto del probando.

Para el análisis de la variante a lo largo de la evolución y la posible localización en las regiones diana de unión a microARN se utilizaron los programas de predicción *MiRanda* y *TargetScan*.

Se estudió la variante en una población de 834 controles mediante la tecnología *KASPar*.

## 9.3. Estudio de posibles mosaicismos del gen *APC*.

Los estudios de mosaicismos se hicieron en tres pasos:

### 9.3.1. Test de proteína truncada en el exón 15 del gen *APC*.

Dividimos el exón 15 en cuatro secciones (Tabla MII) que se amplifican por separado en las 21 muestras más un control positivo. El PTT se llevó a cabo en los laboratorios del Dr. Chong en el *Lady Davies Institute* en Montreal. Para ello se utilizó el *TNT® Quick Coupled Transcription/Translation* de la casa comercial *Promega* y siguiendo el protocolo del fabricante que está disponible en:

<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/tnt-quick-coupled-transcriptiontranslation-system-protocol/>

Segmento	Primer sense	Primer antisense
<b>A</b>	5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA TGAATGCATGTGGAACCTTTGTGG3'	5'CCGTGGCATATCATCCCC3'
<b>B</b>	5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA TGGTTTCTCCATACAGGTCACGG3'	5'TTGTGGTATAGGTTTACTGGTG3'
<b>C</b>	5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA TGGAAAACCAAGAGAAAGAGGAG3'	5'AGGACTTATTCCATTTCTACC3'
<b>D</b>	5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA TGTGTTTATCTAGACAAGCTTCG3'	5'AGAGTGCCTCCCAAATAAGACC3'

**Tabla MI I:** secuencia de las sondas utilizadas en el Test de Proteína Truncada

En un segundo paso se estudió por secuenciación directa en ADN genómico extraído de sangre periférica la sección 2 del exón 15 de *APC* en aquellos pacientes con una patrón de bandas aberrante.

El tercer paso consistió en estudiar en pólipos de colon de los pacientes de interés la misma sección del exón 15 para comparar la secuencia con la anterior y corroborar lo resultados. El ADN tumoral de material fresco o parafinado se extrajo según el protocolo detallado en los apartados 1.4 y 1.5 de estos materiales y métodos.

#### **9.4. Variantes de significado desconocido (VSD) encontradas en los genes *AXIN2* y *GSK3β***

Ambas variantes fueron confirmadas en ADN genómico y en una segunda amplificación de ADN procedente de una nueva extracción cuando fue posible. Al ser variantes de significado desconocido que producían un cambio de aminoácido en la proteína, el primer paso fue el estudio de predicción de su patogenicidad con el programa *Alamut*. Posteriormente se consultaron las bases de datos *1000 genomes* y *Exome Sequencing Project*.

##### **9.4.1. Estudio de la VSD Arg463Cys en el gen *AXIN2***

Para este estudio lo primero que se hizo fue el estudio de la hermana afecta del probando y en la madre para confirmar la segregación de la enfermedad con la variante.

En segundo lugar se realizó una población control de 800 individuos sanos utilizando la tecnología de genotipación *KASPar* con una sonda diseñada para la variante.

El resto de estudios realizados en esta familia fueron a nivel somático y se describen en el apartado 10.

#### 9.4.2. Estudio de la VSD Val317Phe en el gen *GSK3β*

Debido a la imposibilidad de conseguir ADN de otros miembros de la familia en este estudio realizamos directamente una población control en 820 individuos sanos mediante la tecnología *KASPar*.

Además se utilizaron los programas bioinformáticos de predicción de patogenicidad de cambios de nucleótido: *Polyphen*, *Shift*, *SNAP*. *SNPs&go*, *Mutator asesor*.

### 9.5. Poblaciones control para el estudio de variantes mediante la tecnología de genotipación *KASPar*.

#### 9.5.1. Plataforma de genotipado *KASPar*:

##### Principios metodológicos del genotipado mediante sondas *KASPar*

El sistema de genotipado *KASPar SNP Genotyping System* (Kbioscience, Herts, UK) es un método capaz de discriminar SNP mediante una reacción de PCR competitiva alelo-específica. Al igual que la plataforma *TaqMan®*, utiliza el principio de “transferencia de energía por resonancia de fluorescencia” (FRET), pero a diferencia de ésta, es la actividad polimerasa, y no la actividad exonucleasa, la que produce la emisión de fluorescencia. De hecho, el ensayo *KASPar* utiliza una enzima *Taq* polimerasa modificada, que carece de actividad exonucleasa. Los componentes que intervienen en el genotipado se muestran en la Figura M4, y consisten en:

- Dos *primers* sentido sin marcar, que compiten por la unión al ADN molde. Cada uno de ellos tiene en 3' la base complementaria a cada uno de los alelos del SNP a genotipar, respectivamente, de forma que sólo se unirán al ADN problema en presencia de la base correspondiente. Además, en 5', estos *primers* portan sendas colas de oligonucleótidos universales, con secuencia desconocida y propiedad de *KASPar*, que permiten la hibridación posterior con *primers* universales marcados.
- Un *primer* antisentido común sin marcar, que confiere especificidad de *locus*, pero que se une en presencia de ambos alelos del SNP. Dos *primers* universales marcados, cada uno de ellos con una secuencia complementaria a las colas de los *primers* sentido. Estos *primers* tienen unidas dos moléculas: un fluorocromo (FAM o VIC) y un grupo receptor de fluorescencia o *quencher*. La estructura de horquilla de esta molécula hace que el fluorocromo y el *quencher* estén muy próximos, de forma que no hay emisión de fluorescencia detectable.

Como se muestra en la Figura M4, el proceso de genotipado comienza con la hibridación competitiva de los *primers* en función de la variante de interés. Durante la fase de extensión, se añaden las colas universales a los amplicones de la región del SNP. En los siguientes ciclos, los *primers* universales marcados serán capaces de unirse a esas colas, sustituyendo a los *primers* iniciales. El alejamiento del fluorocromo del *quencher* produce emisión de fluorescencia detectable a la longitud de onda de FAM, VIC o ambos, que indicará la presencia de un alelo, otro o los dos, respectivamente.

Cada reacción de genotipado *KASPar* se realiza sobre un volumen total de 4  $\mu$ l, y consta de:

- El ADN genómico problema. Utilizamos 10 ng de ADN, dispensando 2  $\mu$ l de una dilución a 5 ng/ $\mu$ l.
- La solución *KASPar reaction mix* que contiene la polimerasa modificada, su cofactor MgCl<sub>2</sub>, el tampón de reacción y los *primers* universales marcados con fluorescencia.
- El reactivo específico de cada reacción, con los *primers* sentido y antisentido diseñados por *Kbioscience* para amplificar la región de interés.
- En algunos casos, la reacción se suplementa con MgCl<sub>2</sub> adicional, hasta una concentración final de 2,2 mM.

La secuencia de los *primers* utilizados exceptuando las regiones que son propiedad de la casa comercial y los alelos marcados se resumen en la Tabla M12.

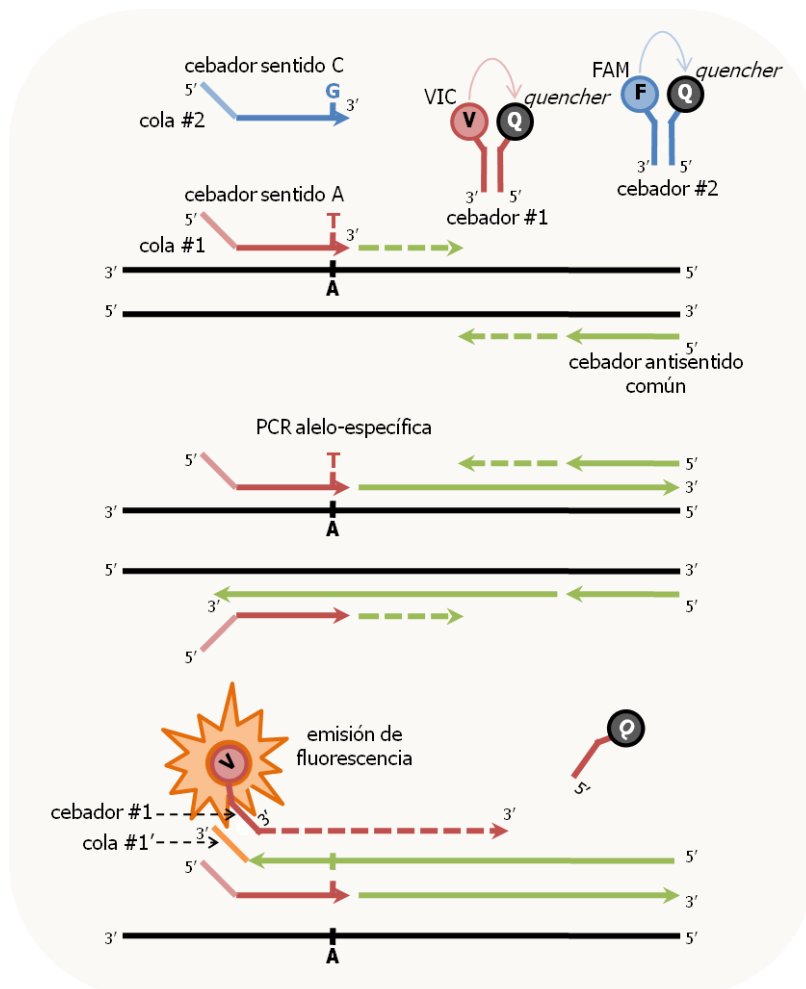
Sondas KASPar					
ID-Sondas	Primers	Secuencias	Alelos		CG%
			FAM	VIC	
AXIN2e5-cd463	Alelo FAM	CCGGGGAGCGGGAGCG	C	T	FAM_82,4
	Alelo VIC	GTCCGGGGAGCGGGAGCA			VIC_77,83
	Común	CTCCRGCGTAGGCCGCTATA			Common_64,3
Prom1b_ APC-	Alelo FAM	AGCAGCGGCTAGGCTCCG	C	T	FAM_68,4
	Alelo VIC	AGCAGCGGCTAGGCTCCA			VIC_63,3
	Común	AAGATGGCGGAGGGYAAGTAGCAA			Common_52,1
GSK3B_e10_cd317	Alelo FAM	TCTTCCCTTTTTTGTACTGCAGG	G	T	FAM_38,5
	Alelo VIC	GTTCTTCCCTTTTTTGTACTGCAGT			VIC_33,3
	Común	GTGCAATTGCCTCCGGTGGAGTT			Common_56,5
Int3_ APC-105	Alelo FAM	ATATTCAGCATGATGAATGAGGAAAATATG	C	T	FAM_30
	Alelo VIC	AAATATTCAGCATGATGAATGAGGAAAATATA			VIC_24,2
	Común	CTCTTTGGARGCTTTTGAATGTTTTGGTAT			Common_35
3'UTR_ APC-965	Alelo FAM	AAGAAAGAGGAAATTATGTGGGCCTAT	A	G	FAM_35,7
	Alelo VIC	GAAAGAGGAAATTATGTGGGCCTAC			VIC_44
	Común	CCTAGCACAGACTAAGCATTGAGCAT			Common_46,2

**Tabla M12:** Sondas KASPar utilizadas en las poblaciones control



### 9.5.2. Protocolo específico de genotipado

El sistema de genotipado *KASPar* fue la plataforma elegida para realizar las poblaciones control de análisis de variantes de significado desconocido realizadas en nuestro estudio, ya que permite el genotipado de un alto número de muestras a un coste menor. En total, genotipamos cinco VSD con esta tecnología (Tabla M12), en una población de entre 800 a 855 controles. Utilizamos un robot *Beckman Coulter Biomek® NXP* (Brea, CA, USA) para dispensar 10 ng de ADN g genómico de cada muestra desde placas de 96 pocillos a placas de 384, donde se realizaron las reacciones de genotipado. La capacidad de discriminación de cada sonda, se probó primero en 24 controles dispensados en duplicado. Además, ya con las muestras de interés, por cada placa de 96 pocillos, se incluyeron cuatro blancos y como controles heterocigotos positivos se incluyeron casos portadores de la variante en triplicado. El mismo control positivo en triplicado se incluyó en todas las placas de una misma población control para minimizar un posible sesgo interensayo.

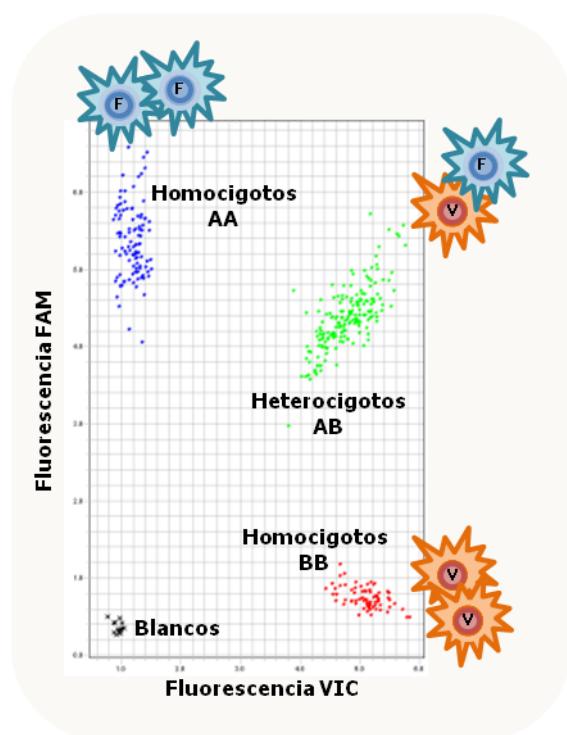


**Figura M4.** Representación esquemática del genotipado mediante el sistema *KASPar*. Inicialmente, los *primers* sentido compiten por la unión al ADN en función de la secuencia del SNP. Además, se añaden colas universales a los amplicones generados. Estas colas son reconocidas por los *primers* marcados, cuyo alejamiento del *quencher* permite la emisión de fluorescencia. Adaptado a partir de lo descrito en la web del proveedor de la tecnología *KASPar*:

<http://www.kbioscience.co.uk/download/KASP.swf>

### 9.5.3. Interpretación de los resultados de genotipado por *KASPar*.

El análisis del genotipado mediante *KASPar* se realiza en base a la fluorescencia a tiempo final detectada. La fluorescencia a tiempo final, que es el resultado de la cantidad de ADN inicial y, sobre todo, de la presencia de un determinado alelo de la variante a estudiar, se detectó utilizando el equipo *ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detector* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Después, mediante el programa *SDS*, versión 2.2.2, suministrado por la misma casa comercial, se analizaron los distintos grupos de fluorescencia, como se muestra en la Figura M4. Para el análisis de los tres grupos para cada SNP (homocigotos para el alelo *wildtype*, heterocigotos y homocigotos del alelo polimórfico), siempre se tuvo en cuenta el patrón de fluorescencia (intensidad y capacidad de discriminación), obtenido en el grupo inicial de controles en el que se probó cada sonda, de forma que, aquellas muestras para las que el programa no asignó un genotipo automáticamente, se agruparon de forma manual si reunían las condiciones adecuadas. Finalmente, los genotipos se exportaron, ya en formato de texto (“*al1al1*”, “*al2al2*”, “*both*”, “*undetermined*”), primero a un archivo de texto sin formato (\*.txt), y luego a una tabla *Excel*, para su posterior conversión en los genotipos correspondientes y análisis estadístico.



**Figura M5.** Análisis de los genotipos obtenidos con la plataforma *KASPar*. La imagen muestra la asignación automática de genotipos que realiza el programa *SDS* 2.2.2, en función de los valores de fluorescencia obtenidos para cada muestra, representadas como puntos de colores en los ejes cartesianos.

## 10. ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE LA VARIANTE R463P DEL GEN *AXIN2* A NIVEL SOMÁTICO.

Para un estudio en profundidad de la posible patogenicidad de la variante R463C del gen *AXIN2* encontrado en la familia 677C, pasamos a realizar una serie de estudios en las muestras de pólipos parafinados del *probando* y su hermana afecta.

### 10.1. Estudio de la pérdida de heterocigosidad (LOH) en ADN obtenido de pólipos parafinados del *probando* y su hermana afecta.

En primer lugar se obtuvo consentimiento informado de los pacientes según el modelo incluido en el Anexo I y se solicitaron las muestras parafinadas a los servicio de Anatomía Patológica pertinentes. Dos pólipos adenomatosos de bajo grado de displasia del *probando* y cuatro pólipos de su hermana (dos adenomas de bajo grado de displasia y dos pólipos hiperplásicos), nos fueron remitidos.

La muestra fue valorada por el Dr. Iván Muñoz, un patólogo que seleccionó el área que contenía la región adenomatosa del tejido. Se incluyó este material en un tubo *eppendorf* de 1,5 ml y se procedió a la extracción del ADN según el protocolo detallado en el Apartado 9.1 de estos Materiales y Métodos.

Una vez extraído el ADN de las muestras procedimos a la amplificación del exón 5 en el que se localiza la variante R463P, con una reacción de PCR convencional. Las muestras fueron amplificadas en paralelo con el ADN genómico de cada paciente y purificadas mediante *EXOSAP-it* para su posterior secuenciación. Las condiciones de amplificación y los *primers* utilizados se muestran en la Tabla M13. Cuando fue posible confirmamos los resultados en otra reacción de PCR independiente. La pérdida de heterocigosidad se consideró positiva cuando uno de los dos alelos disminuía un 66% con relación al otro alelo, y siempre teniendo como control la *ratio* entre alelos en ADN genómico amplificado en la misma reacción de PCR.

<i>AXIN2</i> -E5-LOH.		Secuencia 5'-3'
Exón5-LOH	Sentido	AAGACCCGCAGACGATACTG
	Antisentido	ACATGCTTCGTCGTCTGCTT

**Tabla M13.** Secuencia de los *primers* empleados en la amplificación del fragmento del exón 5 del gen *AXIN2* donde se localiza la variante R463C para estudiar una posible LOH.

## **10.2. Estudios de expresión de proteína a nivel de tejido. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.**

Con el objetivo de valorar los niveles de expresión de proteínas en tejido sano y pre-neoplásico de los pacientes se realizaron estudios inmunohistoquímicos contra las proteínas Apc, Axin2 y  $\beta$ -catenina. Los anticuerpos utilizados para ellos se describen en la Tabla S5 del material suplementario. La inmunohistoquímica fue realizada en la Unidad de Inmunohistoquímica del CNIO y valoradas por el Dr. Iván Muñoz, patólogo de nuestro grupo.

Para una mejor caracterización de la expresión proteica de Axin2 y  $\beta$ -catenina en los tejidos, así como para estudiar la presencia o no de colocalización de ambas proteínas se realizaron estudios de inmunofluorescencia con los mismos anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica. La inmunofluorescencia fue realizada en la Unidad de inmunohistoquímica y optimizadas con la ayuda de la Unidad de Microscopía Confocal, ambas del CNIO. Las tinciones dobles para las proteínas Axin2 y  $\beta$ -catenina fueron reveladas con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia. Se llevó a cabo una posterior incubación en DAPI de 5 min y dos lavados de las preparaciones. El medio de montaje utilizado fue *Vectashield* de la casa comercial *VECTOR laboratories*.

Paralelamente a las tinciones en tejido sano y pre-neoplásico del paciente se realizaron los siguientes controles:

- Control de tejido de amígdala sana para la optimización de la técnica
- Tejido de epitelio colorrectal normal
- Tejido de pólipo adenoma-tubular de bajo grado de displasia de un paciente portador de una mutación en el gen *APC*, incluido en este estudio.
- Tinción de anticuerpo secundario fluorescente en ausencia de anticuerpo primario en el tejido problema como control para autofluorescencia del tejido.

Las preparaciones fueron visualizadas en un equipo de microscopía confocal *SP5-MP* de *Leica* con ayuda del Dr. Diego Megías de la Unidad de Microscopía Confocal del CNIO.

## **II. LAS MICROMATRICES DE TEJIDO (TMA) Y EL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO (IHQ)**

Una parte importante de esta tesis consistió en la búsqueda de diferencias en los patrones de expresión de las principales proteínas de las rutas involucradas en la carcinogénesis colorrectal, en muestras de pólipos de pacientes *APC/MUTYH* negativos, en comparación con pólipos de pacientes *APC+*, *MUTYH+*, pólipos esporádicos y pólipos de pacientes con oligopoliposis. El análisis de la variación en la expresión proteica de los tumores se hizo en paralelo mediante la construcción de micromatrices de tejidos y el uso de diferentes anticuerpos.

### **II.1. Las micromatrices de tejido (TMA)**

Siguiendo la descripción clásica de Kononen (Kononen 1998) se construyó una matriz tisular con las muestras seleccionadas de las distintas lesiones polipoideas encontradas en los pacientes de las distintas familias.

De forma resumida se seleccionaron las áreas representativas de los bloques de parafina originales tras haberlas evaluado al microscopio en una sección teñida con hematoxilina eosina. De estos bloques se obtuvieron dos cilindros de 1mm de diámetro que se colocaron en un nuevo bloque de parafina de manera ordenada siguiendo unas coordenadas específicas con una distancia entre ellas de 1,5mm.

Para asegurar la representatividad de los casos el Dr. Iván Muñoz, patólogo, seleccionó las áreas con mayor celularidad. Junto a los pólipos adenomatosos, clasificados como con displasia epitelial de alto y bajo grado y los adenocarcinomas, se incluyeron muestras de mucosa normal de intestino grueso. A la hora de realizar las tinciones se incluyó un control adicional específico de anticuerpo, que sirviera como control interno de la tinción inmunohistoquímica realizada, evitando así falsos negativos en la tinción.

### **II.2. Estudio Inmunohistoquímica (IHQ)**

La IHQ es una técnica basada en el uso de un anticuerpo específico, marcado previamente mediante un enlace químico con una sustancia que puede transformarse en visible sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno. Mediante el uso de técnicas específicas, se localiza e identifica el complejo antígeno-anticuerpo dentro de la muestra a estudiar. En las técnicas inmunoenzimáticas, se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro permitiendo una localización más precisa de las reacciones, y ya que la tinción es permanente y estable, se puede contrastar y

evaluar con microscopio de luz. Algunas de las enzimas más utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul).

La IHQ tiene utilidad diagnóstica para la identificación de marcadores pronósticos de neoplasias (marcadores tumorales). Por ejemplo, es posible la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores de tumores con anticuerpos monoclonales. Un elemento importante a considerar es la óptima preservación del tejido y por ende de los antígenos. La mayoría de los antígenos se conservan adecuadamente después de la fijación en formalina e inclusión en parafina. Algunos son más lábiles y sólo se detectan en cortes de tejido congelado.

Las técnicas inmunohistoquímicas con los anticuerpos seleccionados se realizaron en la Unidad de Histología e Inmunohistoquímica del CNIO (Dra. Lydia Sánchez). Se cortaron secciones de 3 µm de tejido fijado en formol e incluido en parafina, se desparafinaron durante 12 horas en la estufa a 55°C e hidrataron mediante los siguientes pases de alcoholes: 10 min en xileno (2 veces), 5 min en etanol al 100%, 5 min en etanol al 95%, 5 min en etanol al 70% y 2 min en agua destilada. Dependiendo del anticuerpo utilizado (ver Tabla S5 del Material Suplementario), se realizó desenmascaramiento en baño (*PT LINK*) o en el inmunoteñidor *BOND MAX* utilizando como tampón de desenmascaramiento o recuperación antigénica, citrato sódico 10 mmol a pH 6.2, o Tris-EDTA o EDTA 1mM. A continuación se realizó la inactivación de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% (solución bloqueante S2023, *DAKO, Glostrup, Dinamarca*), durante 10 min a TA. Después de la incubación con el anticuerpo primario a la dilución adecuada, la inmunodetección se realizó con polímeros de alta sensibilidad a los que van unidos moléculas de inmunoglobulinas anti-ratón y anti-conejo (anticuerpo secundario), además de la enzima peroxidasa que, con una posterior incubación con el sustrato diaminobenzidina, produce una reacción cuyo producto, de color marrón, es visible al microscopio óptico. Todas las técnicas inmunohistoquímicas fueron llevadas a cabo mediante el robot automatizado *Autostainer* (*Dako*) o *BOND* (*Leica*). Por último se contratiñeron las secciones con hematoxilina, se lavaron y deshidrataron mediante los siguientes pases por alcoholes: 3 seg en etanol al 95%, 30 seg en etanol al 100% y 10 min en xileno. Los anticuerpos, las casas comerciales y el método de desenmascaramiento están enumerados en la Tabla S5 del Material Suplementario.

### 11.3. Selección de marcadores:

La elección de marcadores empleados para el estudio inmunohistoquímico se realizó de acuerdo a los datos previamente descritos en la literatura o bien debido al interés por su implicación en rutas o procesos importantes en el desarrollo del cáncer o conforme a nuestros resultados en estudios previos.

### 11.4. Evaluación de la tinción

La Dra. Soledad Alonso García evaluó la intensidad y porcentaje de células positivas en los cilindros incluidos en la matriz tisular. Para el análisis estadístico y con el fin de mantener la reproducibilidad del estudio se utilizaron criterios y puntos de corte claros. De manera resumida, los resultados se separaron en cuatro categorías: 0, ausencia de tinción; 1, positividad en menos del 25% de las células; 2, positividad en el 25-50% de las células; y 3, positividad en más del 50% de las células, considerando en todo momento la expresión de la proteína en las células displásicas/neoplásicas.

Como criterio general, estos puntos de corte se seleccionaron de manera que facilitasen la reproducibilidad de los resultados, considerando estudios similares publicados en la literatura e intentando, en la medida de lo posible que tuvieran un significado biológico. En este sentido, para algunos marcadores, en los que el porcentaje de células positivas era bajo en las lesiones polipoideas se modificaron los puntos de corte con el fin de dar un sentido a su expresión manteniendo las categorías (ejemplo *Burb1* y *Cdk2*).

En nuestra serie, el grado de concordancia con los duplicados fue del 97%.

## 12. Análisis de resultados y test estadísticos.

### 12.1. Test estadísticos para comparar características clínicas de la serie completa de FAP en población española.

Para analizar los resultados correspondientes a la primera parte de este estudio en el que se describe la serie completa de casos PAF (N=136), se utilizó el programa *SSPS vs 17.0*. Los análisis estadísticos aplicados fueron: *Chi-cuadrado* o *test de Fisher*, según requerimientos del número de casos para analizar datos categóricos. Para analizar datos continuos en la comparación entre grupos se aplicó una *ANOVA* y una *t-Student*.

### 12.2. Análisis de agrupamiento o *clustering* no supervisado en los perfiles inmunohistoquímicos

Los agrupamientos jerárquicos no supervisados se realizaron mediante el programa *Gene Pattern (Broad Institute)* que permite generar un dendrograma y un diagrama de expresión

estableciendo una gama de color desde el azul intenso al rojo intenso según la mayor o menor expresión de la proteína. Para las agrupaciones se utilizaron los datos de inmunohistoquímica como variables continuas, utilizando el porcentaje de células con expresión de la proteína correspondiente codificado en 0, 1, 2 y 3.

### **12.2. Análisis supervisado de las muestras.**

Para los análisis estadísticos supervisados de nuestras muestras se dividieron en grupos correspondientes al tipo de familia o al grupo histológico y se aplicaron los test de *Chi2* de *Pearson* para comparar variables categóricas entre los grupos utilizando el programa estadísticos SPSS. Se utilizó el test de *Fisher* cuando el número de muestras lo requería.

En todos los estudios, las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de *p* asociado a la prueba estadística de contraste era menor de 0,05.





---



RESULTADOS



Los resultados de esta tesis se dividen en cinco apartados:

1. **RESULTADOS I:** CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR EN FAMILIAS CON POLIPOSIS ADENOMAOSA FAMILIAR DE TIPO CLÁSICO.
2. **RESULTADOS II:** ESTUDIO MOLECULAR EN FAMILIAS *APC/MUTYH* NEGATIVAS.
3. **RESULTADOS III:** ESTUDIO DE OTROS GENES WNT
4. **RESULTADOS IV:** ESTUDIO DE GENES QUE NO PERTENECEN A LA VÍA WNT
5. **RESULTADOS V:** PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS PÓLIPOS ADENOMATOSOS



## RESULTADOS I

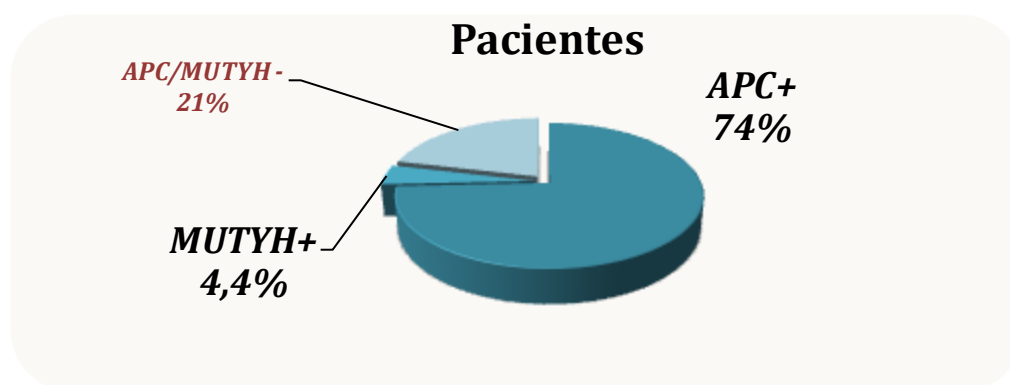
### I. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR EN FAMILIAS CON POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR DE TIPO CLÁSICO.

#### I.1. Descripción de la serie y mutaciones en APC

Entre los años 2001 y 2009, 136 familias con diagnóstico de PAF clásica fueron atendidas en las Consultas de Cáncer Familiar y Consejo Genético del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y del Instituto Catalán de Oncología. En el transcurso de cada consulta y dentro del proceso de consejo genético, se completó un árbol genealógico de al menos tres generaciones, con los datos clínicos de cada uno de los miembros de la familia. Se recogieron informes médicos de los tumores o patologías relevantes, y consentimientos informados para la realización del estudio genético, así como para la petición de tejido parafinado al hospital donde, bien el probando, bien un familiar afectado con poliposis, había sido intervenido.

El 59,6% (81/136) de los probandos presentaba historia familiar de poliposis adenomatosa y el 40,4% (55/136) restante eran aparentemente el primer caso de poliposis en la familia. En 12 de estos 55 casos nos fue posible confirmar la naturaleza *de novo* del síndrome, mientras que ciertas dificultades en la obtención de muestras de familiares (fallecimiento o falta de colaboración) nos impidió confirmar el origen del síndrome en los 43 casos restantes.

La tasa de detección de mutaciones y los tipos de mutaciones fueron similares en las muestras de ambos centros. En el conjunto, se identificó una mutación causal en el 78,7% (107/136) de las familias.



**Figura RI:** Esquema de porcentajes de genotipos en la serie completa. APC+: Casos en los que se identificó una mutación patogénica en el gen APC. MUTYH+. Casos en los que se identificó una mutación patogénica en el gen MUTYH. Todos estos casos mostraron un patrón de herencia recesivo. APC/MUTYH-: Casos en los que no se detectaron mutaciones ni en APC ni en MUTYH en el estudio de rutina.

Los tipos de mutaciones y las frecuencias de las mismas se describen en la Tabla R1.

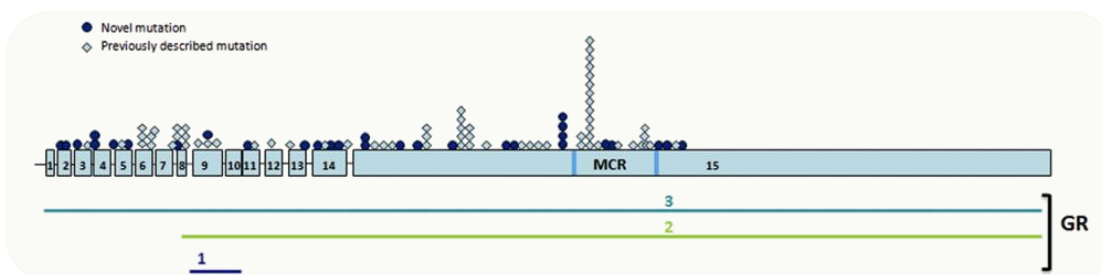
	PAF Familiar n (%)	PAF No familiar n (%)	Total n (%)
<b>Casos</b>	81 (59,6)	55 (40,4)	136 (100)
<b>APC positivos <sup>1</sup></b>	<b>65 (64,4)</b>	<b>36 (35,6)</b>	<b>101 (74,3)</b>
<b>Tipos de mutaciones</b>			
Pequeñas deleciones	34 (52.3)	14 (38.9)	48 (47.5)
Sin sentido ( <i>nonsense</i> )	20 (30.7)	10 (27.8)	30 (29.7)
Pequeñas inserciones	4 (6.2)	8 (22.2)	12 (11.9)
<i>Splicing</i> <sup>2</sup>	3 (4.6)	2 (5.6)	5 (4.9)
Grandes reordenamientos	4 (6.2)	2 (5.6)	6 (5.9)
<b>Mutaciones distintas encontradas</b>	41	28	64
<b>Mutaciones descritas previamente</b>	26	18	38 (59.4)
<b>Mutaciones noveles</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>25 (39.6)</b>
<b>Mutaciones "recurrentes" <sup>3</sup></b>			
<i>c.423-2A&gt;G.</i>	2	0	2
<i>c.646C&gt;T</i>	1	2	3
<i>c.694C&gt;T</i>	1	1	2
<i>c.847C&gt;T</i>	1	1	2
<i>c.2327_2328delTA</i>	2	0	2
<i>c.2805C&gt;A</i>	2	0	2
<i>c.3183_3187delACAAA</i>	4	1	5
<i>c.3202_3205delTCAA</i>	3	0	3
<i>c.3562_3565delCCTT</i>	3	0	3
<i>c.3880C&gt;T</i>	2	0	2
<i>c.3927_3931delAAAGA</i>	6	6	12
<i>c.4394_4395delAG</i>	3	0	3

**Tabla R1:** Mutaciones identificadas en el gen *APC*. <sup>1</sup> Casos en los que se identificó una mutación en el gen *APC*.

<sup>2</sup> Mutaciones que provocan un procesamiento aberrante de los exones. <sup>3</sup> Mutaciones que aparecen en más de una familia en la presente serie.

Las mutaciones encontradas en los genes *APC* y *MUTYH* se describen en las Tablas de S3 y S4 del Material Suplementario.





**Figura R2:** Representación de la localización de las mutaciones a lo largo del gen *APC*

Todas las mutaciones encontradas en el gen *APC* producen un truncamiento de la proteína y no se encontró ninguna mutación de sentido erróneo (*missense*).

Las mutaciones se localizaron entre los codones 49 y 1569 del gen, principalmente a lo largo del exón 15 (58,4%) (Figura R2). En los exones 1, 4, 7 y 10 no se encontraron mutaciones. Estos resultados y las proporciones de mutaciones en localizaciones específicas, puntos calientes del gen, están detallados en la publicación Rivera *et al* (**Rivera 2011**)

## 1.2. Correlación Genotipo-fenotipo

En las 136 familias se analizó la correlación genotipo-fenotipo teniendo en cuenta la edad de diagnóstico de la enfermedad, el número de pólipos desarrollado por los portadores y la presencia o no de manifestaciones extracolónicas.

### 1.2.1. Edad de diagnóstico.

La edad media de diagnóstico de los probandos fue de 33 años (rango 1-81). Las edades medias para casos familiares y aquellos sin historia familiar fueron 32 (1-81) y 35 años (8-63), respectivamente.

En aquellos casos portadores de mutaciones en el gen *APC* la edad media de debut de la enfermedad fue de 31 años (1-81), ascendiendo a 45 años (22-63) para los portadores de mutaciones bialélicas en *MUTYH*.

En general las edades de debut más tempranas se asocian a mutaciones localizadas en las proximidades del codón 1309 dentro del MCR. Veinte años (1-43) fue la edad media de debut para pacientes con mutaciones en el MCR, mientras que esta edad ascendía a 34 años (12-54) para las mutaciones localizadas en el resto del exón 15 siendo también 34 años (13-81) la edad media asociada a mutaciones en otras partes del gen, y, 33 años (18-51) la edad asociada a grandes reordenamientos del gen *APC* ( $p=0,001$ ).

### 1.2.2. Número de pólipos

Siete familias fueron diagnosticadas con una poliposis severa por presentar más de 1000 pólipos en el momento del diagnóstico. Sólo en una de ellas no se pudo identificar ninguna mutación en *APC* y *MUTYH*. Uno de estos pacientes (ID 54, Tabla S3 del Material Suplementario) resultó portador de una mutación en el codón 1309 (Figura R2), mientras que los casos restantes portaban mutaciones en los codones 49, 216, 805, 1075, y 1113. Sorprendentemente no se identificaron fenotipos severos asociados a grandes reordenamientos del gen *APC*. Dos mutaciones no descritas previamente se asociaron a la presencia de más de 1000 pólipos (c.145delAAAC y c.3337\_3338delAA, Tabla S3, del material suplementario).

### 1.2.3. Manifestaciones extracolónicas.

Sesenta y dos (45,6%) de los probandos desarrollaron algún tipo de manifestación extracolónica (ME). Cuarenta y cinco de ellos eran casos familiares (representando así el 55,5% de todos los casos familiares) y 17 casos sin antecedentes familiares del síndrome (esto es, el 30,9% de los casos sin antecedentes). Estas cifras corresponden a valores mínimos debido a la ausencia de información en algunos casos principalmente en las manifestaciones benignas. La Figura R3 muestra la distribución de las manifestaciones de acuerdo a la localización de la mutación en el gen *APC*. La mayor proporción de las ME (14/18, 77,8%) se observa en los pacientes que portan mutaciones entre los codones 500 y 1000. Más de la mitad de todas las mutaciones puntuales (49/95) se localizan entre los codones 1000 y 1569, y prácticamente la mitad de estas (24/49, 49%) se asociaron a algún tipo de ME. Cabe señalar una importante variabilidad en el tipo de ME asociada a las mutaciones en los codones 1061 al 1068 (seis ME diferentes), y 1465 (cinco ME diferentes).

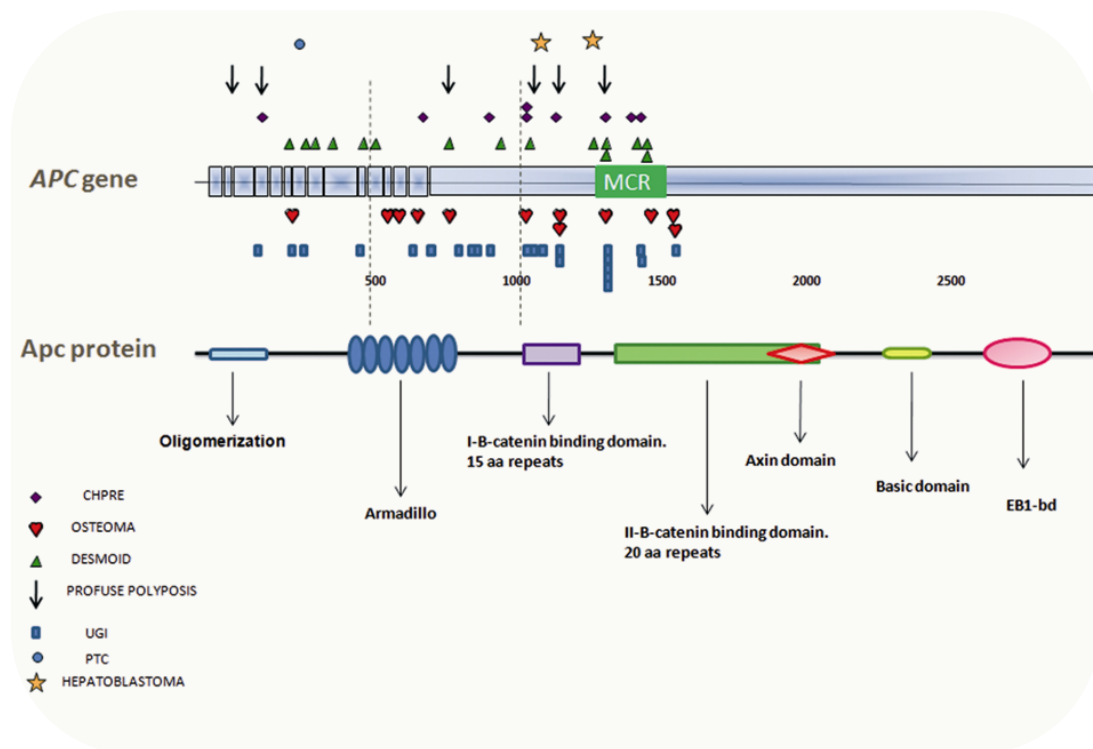
Los pólipos digestivos superiores son la ME más común, apareciendo en 29 familias: 24 de ellas con mutaciones en *APC*, dos familias con *PAAM*, y 3 familias sin mutación en *APC/MUTYH*. Las mutaciones asociadas a estos pólipos se distribuían a lo largo de todo el gen *APC*.

Los tumores desmoides se observaron en 19 familias (14%): 18 *APC* positivas y 1 sin mutación detectable en *APC/MUTYH*. Los desmoides se asociaron a diferentes tipos de mutaciones, incluidos los grandes reordenamientos, y principalmente localizadas entre los codones 230 y 499 y 805 al 1465. Llamativamente tan solo 3 de estas familias portaban mutaciones más allá del codón 1400. Sólo en una familia (ID 28, Tabla S3, del Material Suplementario), hubo más de un integrante afectado con desmoides.

Los osteomas se detectaron en 15 familias (11%) y se asociaban a todo tipo de mutaciones entre los codones 500 y 1000 (Figura R3.), Trece familias fueron APC positivas, 1 familia PAAM, y 1 sin mutación detectable en *APC/MUTYH*.

Por su parte, la hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina se asociaba a mutaciones entre los codones 1000 y 1569 (Figura R3.), y se diagnosticó tan sólo en 10 familias (7,4%), todas ellas fueron APC positivas, excepto una *APC/MUTYH* negativa.

Un hepatoblastoma fue diagnosticado en 3 familias: 2 de ellas APC positivas y una *APC/MUTYH* negativa. El carcinoma papilar de tiroides se diagnosticó en 2 familias, una con mutación en APC y la otra sin mutación detectable en *APC/MUTYH*. Finalmente, un carcinoma duodenal fue detectado en una familia APC positiva y en otra *MUTYH* positiva, y, por último, el carcinoma gástrico se observó en dos casos *APC/MUTYH* negativos.



**Figura R3:** Esquema de los dominios de la proteína Apc en el que se representa la asociación entre la localización de la mutación y la manifestación extracolónica desarrollada.

### 1.2.4. Familias PAF con estudio genético negativo.

Hemos comparado las principales características clínicas entre familias con mutaciones en *APC* (n=101) y aquellas en las que no se ha detectado ninguna alteración en los genes *APC* y *MUTYH* (Tabla R2).

Características clínicas		<i>APC</i> + N=101	<i>APC/MUTYH</i> – N=29	P-valor
Casos Familiares/no familiares (%)		64.4/35.6	48.3/51.7	NS
Formas severas* (%)		5.9	3.5	NS
Edad de debut (años)	Todos los casos	30.6	40.3	0.002
	Casos no familiares	30.1	42.3	0.004
Presencia de ME (%)		50.5	27.6	0.024

**Tabla R2.** Comparación de las características clínicas entre familias: *APC* positivas (*APC*+) y *APC/MUTYH* negativas. \* Se consideraron formas severas cuando uno de los individuos de la familia desarrolló más de mil pólipos

Con el objetivo de evitar sesgos debido al diagnóstico más temprano en aquellos casos con historia familiar de PAF, hemos considerando la presencia de antecedentes familiares para calcular la media de edad de debut de la enfermedad: 30 años en los pacientes sin antecedentes familiares con mutación en *APC* y 42 en aquellos sin mutación detectable en *APC/MUTYH* ( $p=0,004$ ). El porcentaje de casos sin historia familiar fue modestamente más alto en los positivos y la presencia de poliposis severas menos frecuente en el grupo de los casos negativos, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En lo que respecta al desarrollo de ME también se detectan diferencias: 50,3% de los casos *APC* positivos tuvieron algún tipo de ME, mientras que este porcentaje cae hasta el 27,6% en los *APC/MUTYH* negativos ( $p=0,024$ ). Las frecuencias de HCEPR, tumores desmoides, pólipos digestivos del tracto intestinal superior y osteomas se reduce casi a la mitad en los casos negativos con respecto a los *APC* positivos. Por el contrario la presencia de tumores distintos del cáncer colorrectal resultó ser mayor en las familias *APC/MUTYH* negativas.

## RESULTADOS II

### 2. ESTUDIO MOLECULAR EN FAMILIAS *APC/MUTYH* NEGATIVAS.

Para llevar a cabo el segundo apartado de esta tesis se recogió la información y el material biológico de 26 familias diagnosticadas de PAF clásica y de dos familias con un fenotipo atenuado, todas ellas sin mutación detectable en el gen *APC*, ni ninguna de las mutaciones recurrentes en el gen *MUTYH*. En la Tabla R3 se relacionan dichas familias negativas.

Familia	Historia Familiar
0010-98C	Caso único sin antecedentes familiares.
0163-99C	Historia familiar de PAF.
66C	Padre CCR >60 años. Tía paterna CCR y cáncer de endometrio > 60 años.
105C*	Hermana PAF y CCR a los 57 años. Madre CCR. Hijos pólipos adenomatosos a los 40.
0220-99C	Madre y tío materno con CCR >60 años.
126C	Caso único sin antecedentes familiares. Tío materno con posible cáncer gástrico a los 37 años
218C	Caso único sin antecedentes familiares.
221C	Padre y tío paterno CCR a los 49 años. Primo PAF.
293C	Caso único sin antecedentes familiares.
0323-00C	Madre con PAF y CCR a los 37 años.
341C	Madre PAF severa y CCR a los 50. Tío materno y primo PAF.
0373-00C	Caso único sin antecedentes familiares.
511C	Padre CCR. Hijos con PAF desde los 8 años.
0519-00C	Caso único sin antecedentes familiares.
620C	Hija PAF a los 21
677C*	Padre CCR a los 51 años. Hermana pólipos adenomatosos, hiperplásicos y CCR a los 36 años.
678C	Caso único sin antecedentes familiares.
679C	Madre CCR y pólipos a los 71 años.
892C	Caso único sin antecedentes familiares.
904C	Caso único sin antecedentes familiares.
1015C	Caso único sin antecedentes familiares.
965C	Hermano PAF a los 54 años
1136C	Hijos con pólipos.
1139C	Padre y tía paterna CCR a los 46 y 58 años, respectivamente.
1641-04C	Caso único sin antecedentes familiares.
2105-05C	Caso único sin antecedentes familiares.
2750-06C	Caso único sin antecedentes familiares.
3986-09C	Padre con cáncer gástrico.

**Tabla R3:** Relación de familias incluidas en el estudio molecular de en familias *APC/MUTYH* negativas.

\* Familias PAFA

## 2.1 Estudio del gen *APC*:

### 2.1.1. Extremo 3' del gen, promotores IA y IB y 3'UTR.

Tal y como se plantea en los objetivos de esta tesis, nuestro primer objetivo fue descartar, en la medida de lo posible, la implicación del gen *APC* en estas familias. Para ello comenzamos por el estudio mediante secuenciación directa del extremo 3' del gen, generalmente asociado a un fenotipo atenuado y con un porcentaje mutacional muy bajo comparado con el resto del gen. El estudio resultó negativo en todos los probandos a excepción de la familia 341C diagnosticada de síndrome de Gardner (Tabla R3, Figura 1 Anexo I), en la que se identificó la mutación portadora de la mutación c.5790delA;pGln1930HisfsX40. El probando desarrolló un fenotipo severo con la presencia de miles de pólipos, además de pólipos duodenales, gástricos y esofágicos y adenomas suprarrenales.

En segundo lugar, se estudiaron por secuenciación directa los promotores IA y IB del gen. Tres variantes fueron halladas en este estudio:

La variante localizada en Chromosoma5:112,043,263 cambio de C>T (Fam 892C, Tabla R3). Las otras dos variantes fueron localizadas en un paciente incluido en el estudio realizado en el ICO y publicado por Castellsagué *et al* (Castellsague 2009), corresponden a la familia 0163-99C (Tabla R3, Figura 9 anexo II), las variantes son g.[112043282C>G(+)|12072889 C>T].

En tercer lugar se estudió la región 3'UTR del gen, una variante, la Chromosoma5:112,181,027 A>G, fue encontrada en la familia 965C (Tabla R3, Figura 2 Anexo I). El estudio de esta variante se detalla en el apartado 2.2 de los Resultados II.

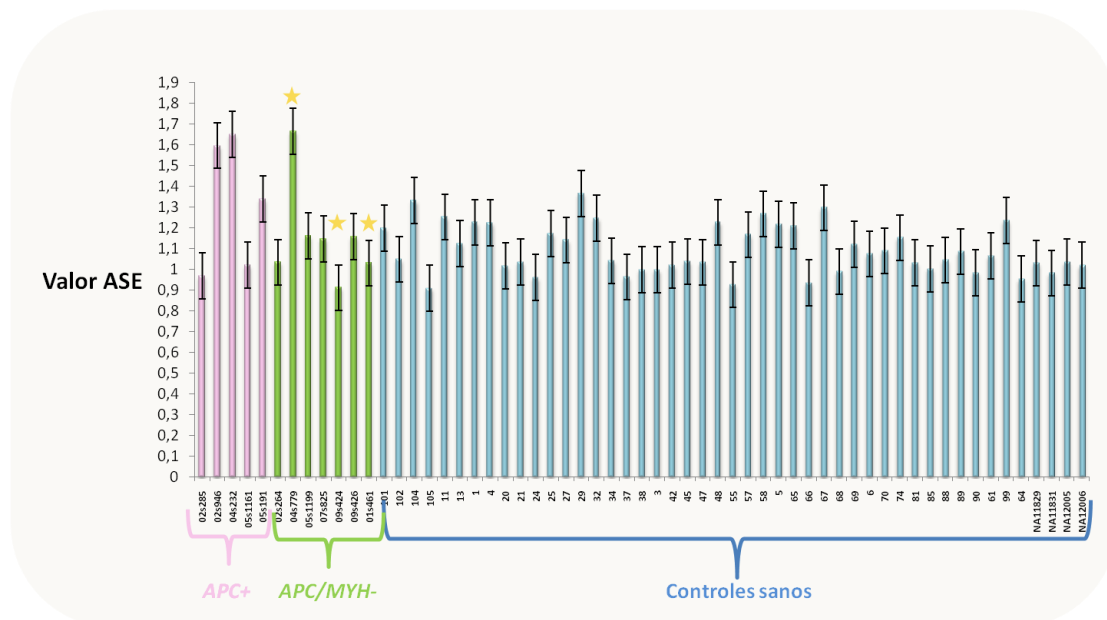
### 2.1.2 Estudios de desbalance alélico, segregación con marcadores microsatélites y metilación de ambos promotores del gen *APC*.

El análisis del gen *APC* continuó con el estudio del desbalance alélico. Recogimos RNA de 11 familias informativas (heterocigotas) para el SNP rs22999222 que se utilizó como marcador para el estudio. Además de estas familias *APC/MUTYH* negativas se incluyeron otras 5 familias con mutaciones localizadas en distintos puntos del gen *APC* y 42 controles heterocigotos sanos más 4 líneas celulares HapMap. Este estudio fue realizado en colaboración con el laboratorio de la Reserca Translacional (Dr. Gabriel Capellá) del ICO, donde laboratorio se analizaron cuatro de los casos (Castellsague 2009). Los restantes 7

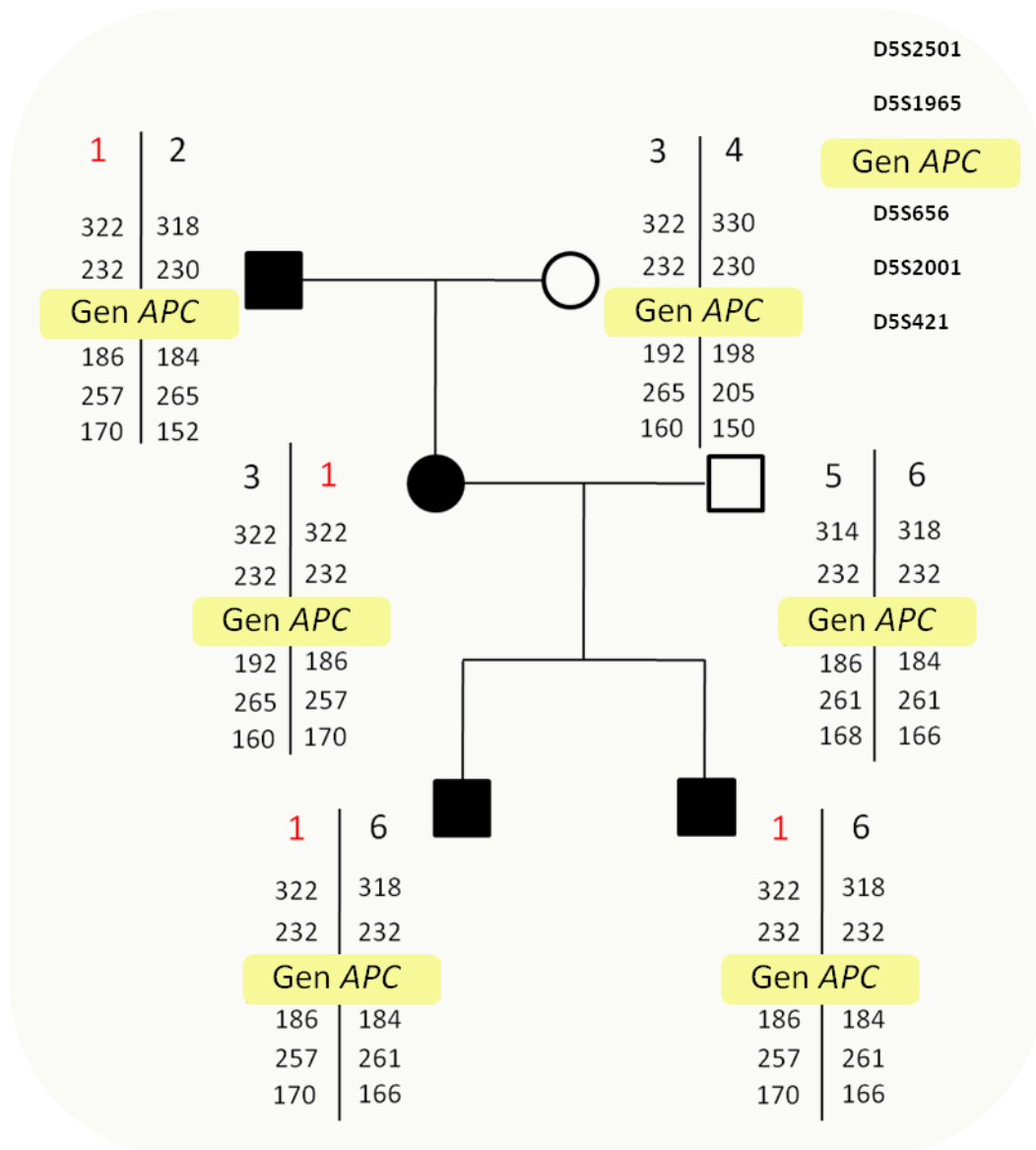
casos *APC/MUTYH* negativos, los casos *APC* positivos y la población control se realizaron en nuestro laboratorio.

La media de expresión específica de alelo ASE para la población normal fue 1,09  $\pm$  0,11.

Los puntos de corte se establecieron en  $>1,5$  y  $<0,67$  lo que representa una diferencia de expresión de un 33%. Dos casos *APC/MUTYH* negativos presentaron valores de desbalance superiores a 1,5, valor de corte superior (Fam 511C y 0163-99C, Tabla R3, Figuras 4 y 11 Anexo I). Otros dos casos *APC/MUTYH* negativos presentaron valores en el límite inferior en, al menos, un experimento (Fam 66C y 620C, Tabla R3, Figuras 5 y 6 Anexo I). La Figura R4 muestra la gráfica con los valores de expresión alélica diferencial (ASE) de los pacientes estudiados en el laboratorio de Genética Humana del CNIO y los controles sanos. Los 4 casos estudiados en los laboratorios de Reserça Traslacional del ICO se describen en la publicación Castellsagué *et al.* (Castellsague 2009)



familiar de fenotipo clásico (Tabla R3, Figura 5 Anexo I). En este caso disponíamos de muestra de la probando, sus dos hijos y padre afectados con PAF y su marido y madre, sanos, por lo que nos fue posible realizar un estudio de segregación de marcadores microsatélites que flanquean al gen *APC*. En dicho estudio comprobamos que la enfermedad segregaba con el *locus* de *APC* como se muestra en la Figura R5.



**Figura R5:** Árbol familiar mostrando la segregación del alelo I con la enfermedad en la familia 511C.

Con el objetivo de descartar la posible implicación de un mecanismo de metilación germinal como responsable de estos desbalances alélicos, realizamos estudios de metilación en ADN de los afectados de la familia 511C (segregación positiva), y de las familias 66C y 620C (Tabla R3, Figuras 6 y 7, Anexo I), con valores de desbalance próximos a los utilizados como puntos de corte. No hubo ningún patrón de metilación significativo por lo que descartamos este mecanismo como responsable de los desbalances alélicos.



### 2.1.3 Estudio mutacional en cDNA. Búsqueda de mutaciones localizadas en regiones intrónicas:

En aquellos casos en los que disponíamos de ARN, procedimos a buscar mutaciones en el cDNA con el objetivo de descartar mutaciones localizadas en regiones intrónicas alejadas y que pudieran causar un procesamiento aberrante del mensajero. Para ello se diseñaron *primers* entrelazados cubriendo desde el exon I, al principio del exón 15 y las zonas de unión entre exones. Dispusimos de ARN en 19 muestras, en 7 casos se encontraron mutaciones. Los siete casos aparecen en la Tabla R3. La familia 511C mostró valores de desbalance alélico y segregación positiva, la familia 0163-99C era portadora de una variante en el promotor 1B y también mostraba desbalance alélico y la familia 620C tenía un valor de desbalance alélico en el límite. (Tabla R3, Figuras 3, 5 y 7, Anexo I). Además se encontraron mutaciones en tres familias no informativas para el estudio de desbalance alélico: familias 221C y 679C y 1136 C (Tabla R3, Figuras 6 y 7 Anexo I). En todos estos casos las mutaciones estaban localizadas en zonas exónicas o en el primer nucleótido del intrón y, no fueron localizadas mediante secuenciación directa del ADN debido a la existencia de polimorfismos en los *primers* diseñados para diagnóstico o cambios en las regiones exónicas disponibles en las bases de datos.

Por último, la familia 105C (Tabla R3, Figura 8, Anexo I) resultó portadora de una alteración que provocaba un procesamiento alternativo del gen *APC*. Ante este resultado decidimos en primer lugar repetir el estudio en ADN con una pareja de *primers* nuevos para descartar un posible falso negativo en el estudio inicial. La secuencia aberrante del gen incluía un inserto de 39pb entre los exones 3 y 4, con el consiguiente desfase del marco de lectura en el transcrito. La validación y el posterior estudio de este caso se detallan en el Apartado 2.2.1 de esta tesis. Las mutaciones encontradas en estos 7 casos se resumen en la tabla R4.

Familia	Mutación
221C	c.646-1G>A
511C	c.1969_1970insAG;p.Arg657Lysfsx14
679C	c.1959-2_1960dup;p.Ile656AlafsX20
620C	c.1866c>A;p.Y622X
105C	c.423-3958C>T
0163-99C	c.1660C>T; p.Arg554X
1136C	c.834+3A>T

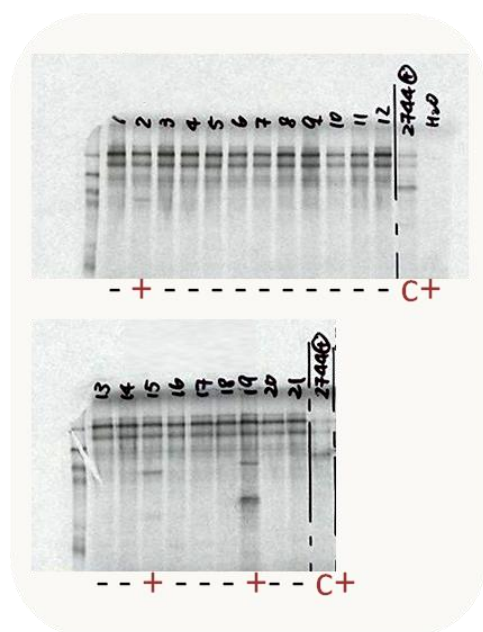
**Tabla R4:** Mutaciones encontradas en el gen *APC* mediante la secuenciación de cDNA

### 2.1.4 Estudio de posibles mosaicismos somáticos mediante el “test de proteína truncada (PTT)”

Dado que se ha comunicado que hasta un 20% de los casos de PAF pueden ser debidos a mosaicismos somáticos del gen *APC* (Aretz 2007; Hes 2008; Necker 2011), decidimos descartar esta posibilidad en nuestras muestras. El estudio de PTT se realizó en el exón 15 del gen en 21 muestras. En tres de las muestras (Familias 126C, 0373-00C y 2750-06C, en la Tabla R3), encontramos patrones de bandeo diferentes al control negativo (Figura R6).

En estos casos se repitió el estudio en ADN genómico, procedente de sangre periférica y en ADN tumoral de los pólipos de los pacientes. En la familia 0373-00C se encontró un resto de mutación en el codón 1462 (c. 4393\_4394delAG;pS1465Wfs3) en línea germinal que podía indicar la presencia de un mosaico. El estudio en tejido tumoral reveló una pérdida de heterozigosidad. La familia 126C presentaba el mismo patrón de bandeo que la familia 0373-00C pero no se encontró rastro de la mutación en la línea germinal del paciente. Se estudió ADN normal y tumoral del colon del paciente confirmándose la misma mutación que en la familia previa c. 4393\_4394delAG;pS1465Wfs3. El cromatograma de la mutación en tejido tumoral mostró una mayor amplificación del alelo mutado lo que demuestra una selección de la población de células con la mutación.

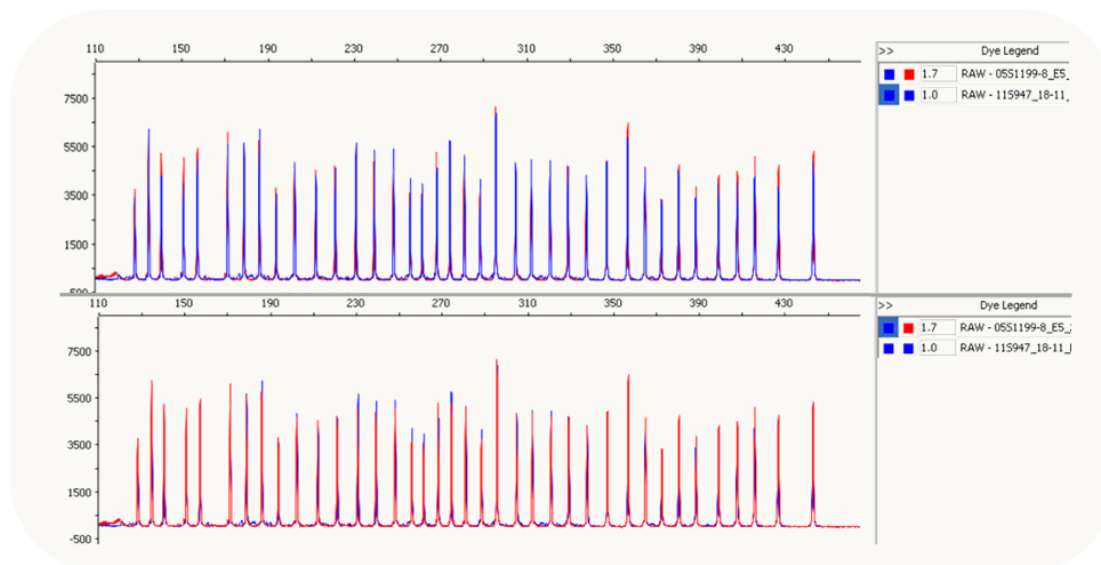
La familia 2750-06C tampoco mostró rastro de mutación en ADN germinal por lo que secuenciamos ADN procedente de un pólipo para todo el segmento analizado en la sección 3 del experimento de PTT. Tan sólo se encontró una variante silente la c.3624C>T;p.Thr1208Thr que no estaba presente en línea germinal. Según la predicción del programa *ESE finder*, dicha variante afecta a un elemento de unión para el procesamiento alternativo del mensajero.



**Figura R6:** La figura muestra el tercer segmento del análisis por PTT del exón 15 de *APC*. Se muestran en rojo los casos positivos; el carril C+ corresponde al control positivo

### 2.1.5. Nuevo estudio de grandes reordenamientos del gen *APC*

Durante el transcurso de esta tesis, ha habido avances en la tecnología utilizada para el estudio genético. Uno de ellos ha sido la actualización del *kit* comercial utilizado para realizar el MLPA del gen *APC*. Este estudio se repitió con el nuevo *kit* (SALSA MLPA P043 *APC* probemix) que incluye sondas para el promotor IB del gen *APC*, en el que recientemente se han descrito la presencia de grandes reordenamientos asociados con la enfermedad (Rohlin 2011). Se estudiaron 21 muestras y el resultado fue negativo en todos los casos (Figura R7).



**Figura R7.** Diagrama de sondas MLPA (P043 *APC* probemix) para una de las muestras problema (rojo) comparado con un control normal (azul).

## 2.2 Estudio validación de las variantes encontradas en el gen *APC*

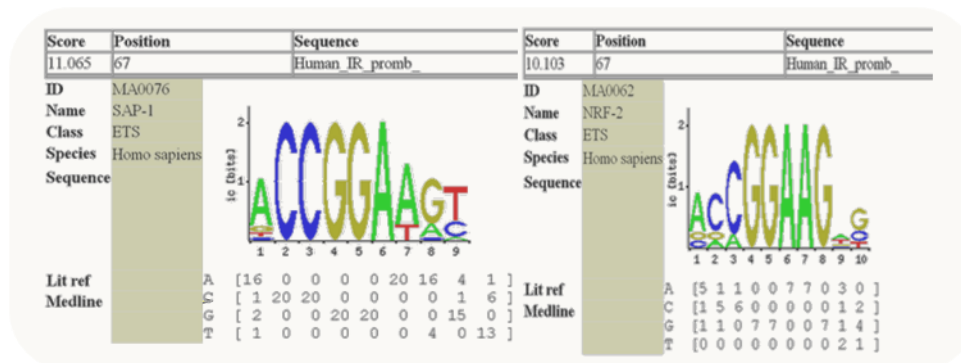
Con el propósito de descartar o no la patogenicidad de las tres variantes de significado desconocido identificadas en los estudios de promotores y región 3'-UTR de *APC*, se realizaron, en primer lugar, búsquedas en bases de datos y predicciones con la ayuda de herramientas bioinformáticas, y, en segundo lugar, estudios en población control española.

La variante localizada en Chromosoma5:112,043,263 cambio de C>T en la familia 892C encontrada en el promotor IB resultó ser un nucleótido conservado en 33 especies eucariotas y localizado en una secuencia diana para la unión de factores de transcripción relacionados con la vía Wnt.

a)



b)

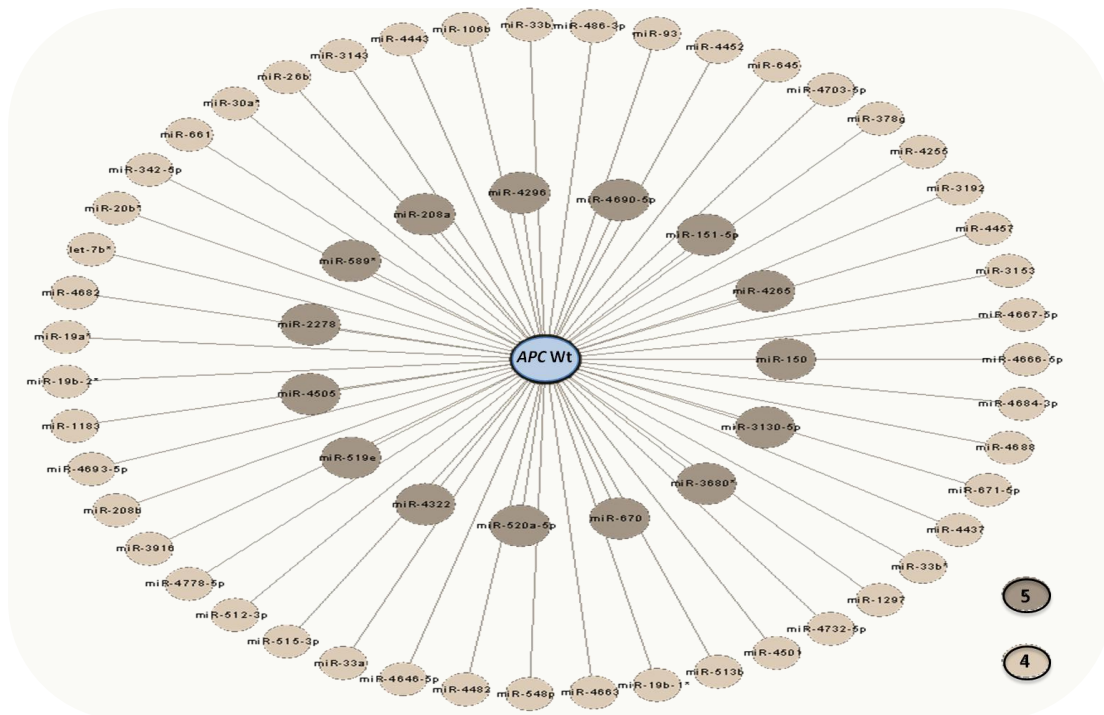


**Figura R8:** a) Predicción del programa ConSite para secuencias dianas de factores de transcripción alrededor del nt 112,043,263. La línea roja marca nuestra secuencia de interés donde los factores E74A, SAP-1, NRF-2 y Bsap se unen y la estrella (★) el nucleótido que cambia. b) Región de unión para SAP-1 y NRF-2 con las posibles combinaciones de bases que forman la unión. Para el factor SAP-1 el nucleótido C (posición 3 del esquema) es uno de los 4 imprescindibles para la unión.

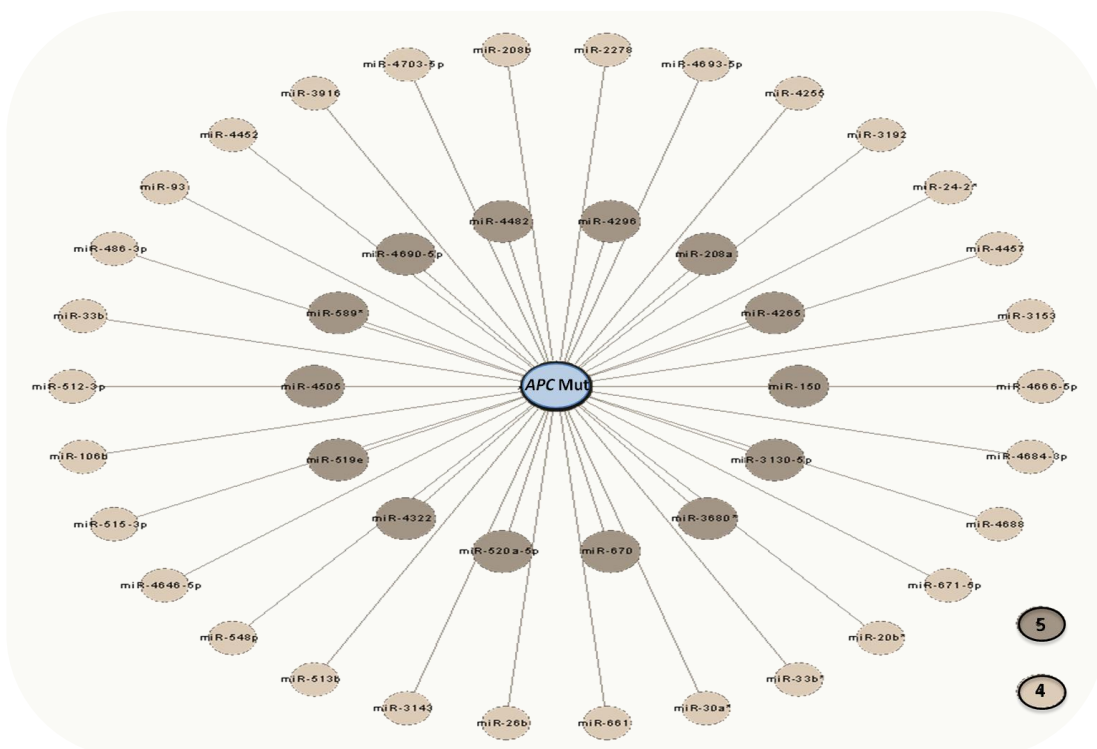
Ante estos resultados que sugerían que el cambio podía ser importante, decidimos hacer un estudio en población control. En este estudio la variante apareció en 6 controles de 268 (2,24%) y por lo tanto la consideramos polimórfica.

Con respecto a las variantes encontradas en la familia 0163-99 y publicadas en Castellsagué et al. (Castellsague 2009), fueron posteriormente consideradas polimórficas ya que en el estudio de cDNA, se encontró una mutación exónica en el paciente.

Por último para estudiar la variante encontrada en el 3'UTR se utilizaron 6 métodos predictivos de sitios de unión para miRNAs. En una primera aproximación se utilizaron estos 6 programas predictivos (TargetScan, Miranda, PicTar, Rnahybrid, Seedmatch y Microtar) para obtener los paneles de miRNAs que potencialmente se unirían tanto al UTR wt de APC como al UTR con la variante (Figuras R9 y R10).



**Figura R9:** Red de miRNAs cuya diana potencial es el 3'UTR-wt del gen APC. En marrón oscuro se muestran aquellos miRNAs cuya predicción es confirmada por 5 de los 6 programas utilizados en este análisis. En el exterior del diagrama, de color más claro, se muestra la colección de miRNAs cuya predicción es confirmada por 4 de los programas utilizados.



**Figura R10:** Red de miRNAs cuya diana potencial es el 3'UTR-1203 A>G del gen APC. En marrón oscuro se muestran aquellos miRNAs cuya predicción es confirmada por 5 de los 6 programas utilizados en este análisis. En el exterior del diagrama, de color más claro, se muestra la colección de miRNAs cuya predicción es confirmada por 4 de los programas utilizados.

Como puede observarse en las Figuras R9 y R10, el número de miRNAs que podrían unirse al 3'UTR del gen *APC* disminuye cuando está presente la variante g. 112,181,027 A>G. Esto nos sugirió que la variante puede ocasionar un cambio en la energía libre de la molécula que afecte a la capacidad de unión de miRNAs a lo largo de todo el UTR.

Mediante el programa *RNAfold* se estimó la energía libre de las dos moléculas que eran de -270,22kcal/mol para la wt y -419,16 kcal/mol para la mutada.

En una segunda aproximación se utilizaron 5 predictores que consideran tanto el cambio en la secuencia como el cambio de energía de la molécula (*TargetScan*, *Miranda*, *PicTar*, *Rnahybrid* y *Microtar*) centrándonos en la región cercana al nucleótido 1203 del UTR, donde se localiza la variante para comprobar su efecto en la creación de nuevas secuencias diana para la unión de miRNAs.

Los resultados se resumen en la siguiente Tabla R5:

a)

<i>APC</i> -3'UTR-wt	Diana para miRNA	Localización en 3'UTR
	Hsa-miR-2113	1199-1205

b)

<i>APC</i> -3'UTR-variante1203		
	Hsa-miR-31*	1198-1205
	Hsa-miR-24-1*	1201-1209
	Hsa-miR-24-2*	1201-1209

**Tabla R5:** Relación de miRNAs que se unirían a la región comprendida entre el nucleótido 1190 y 1210 (alrededor del nucleótido 1203) del 3'UTR donde se localiza la variante g. 112,181,027 A>G. a) miRNA con secuencia diana de unión a 3'UTR wt. b) miRNAs con secuencias diana de unión a 3'UTR con la variante g. 112,181,027 A>G identificada en la familia 965.

Como se aprecia en la Tabla, se pierde el sitio predicho para la unión de hsa-miR-2113 y se ganan sitios de unión para dos miRNAs (hsa-miR-31 y hsa-miR-24). Si tenemos en cuenta el primer análisis que implica el UTR completo y este segundo análisis centrado en la posición 1203 podemos observar que ambos predicen la unión del miR-24-2 al UTR mutado.

Con la finalidad de evaluar la variante en población general se estudiaron 834 individuos controles de los cuales uno resultó portador. Ante este resultado y para la total

caracterización del efecto de esta variante estamos diseñando un panel de experimentos funcionales basados en la medida de la actividad luciferasa.

### 2.2.1. Estudio de caracterización y validación de la mutación localizada en el intrón 3 de *APC*.

En el estudio de cDNA se encontraron 3 mutaciones puntuales y 3 mutaciones que afectaban al marco de lectura dando lugar a una proteína truncada. Una de estas mutaciones (Familia I05C, Tabla R3) corresponde a una inserción de 39 pares de bases entre los exones 3 y 4 (ATGGCCATTTTTCCTCTTTGGARGCTTTTGAATGTTTTG).



**Figura R1 I:** Fragmento de secuencia del cDNA correspondiente a la amplificación de los exones 3 y 4 del gen *APC*. A) Secuencia de control sano. B) Secuencia del probando de la Familia I05C. La barra vertical en rojo marca la unión entre los dos exones.

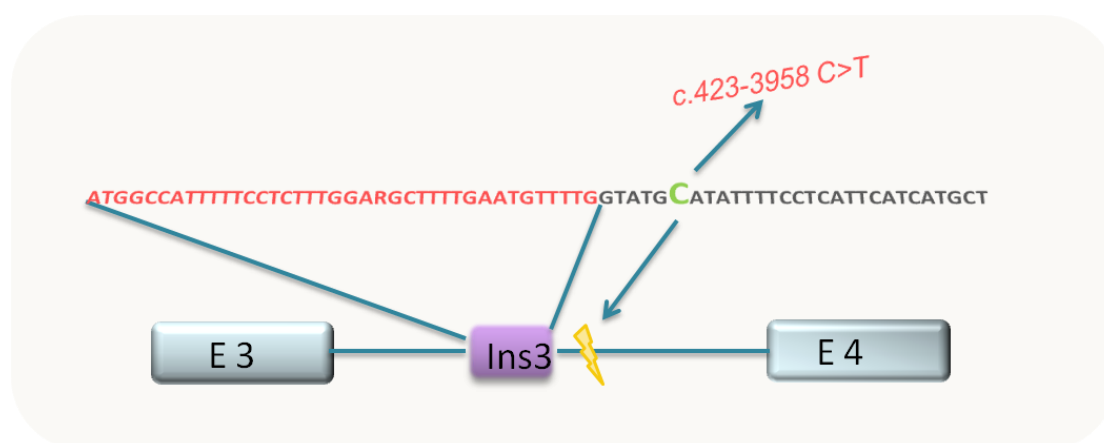
Para intentar averiguar la procedencia de este inserto, se repitió el estudio en ADN genómico de los exones 3 y 4 y las zonas intrónicas adyacentes a los mismos que intervienen en el procesamiento del ARN mensajero.



No se encontró ninguna alteración a nivel de genómico en este nuevo estudio. Mediante el alineamiento de la secuencia del inserto frente a las bases de datos públicas NCBI y la base de datos privada *Alamut*, se comprobó que esta secuencia corresponde a un fragmento del intrón 3 de *APC* localizado aproximadamente en la mitad del intrón.

El intrón 3 tiene un tamaño aproximado de 8kb y comenzamos a sospechar que una mutación en el área cercana al inserto o, por el contrario cercana al final 3' del intrón, podía ser la causante de un procesamiento alternativo aberrante y la consecuente inserción de un nuevo pseudoexón de 39 pb.

Por ello decidimos secuenciar dos fragmentos de más de 600pb en el final del intrón 3 y en los alrededores de la secuencia inserto. Una variante, la c.423-3958C>T, fue encontrada seis pares de bases aguas abajo del comienzo del inserto (Figura R12).



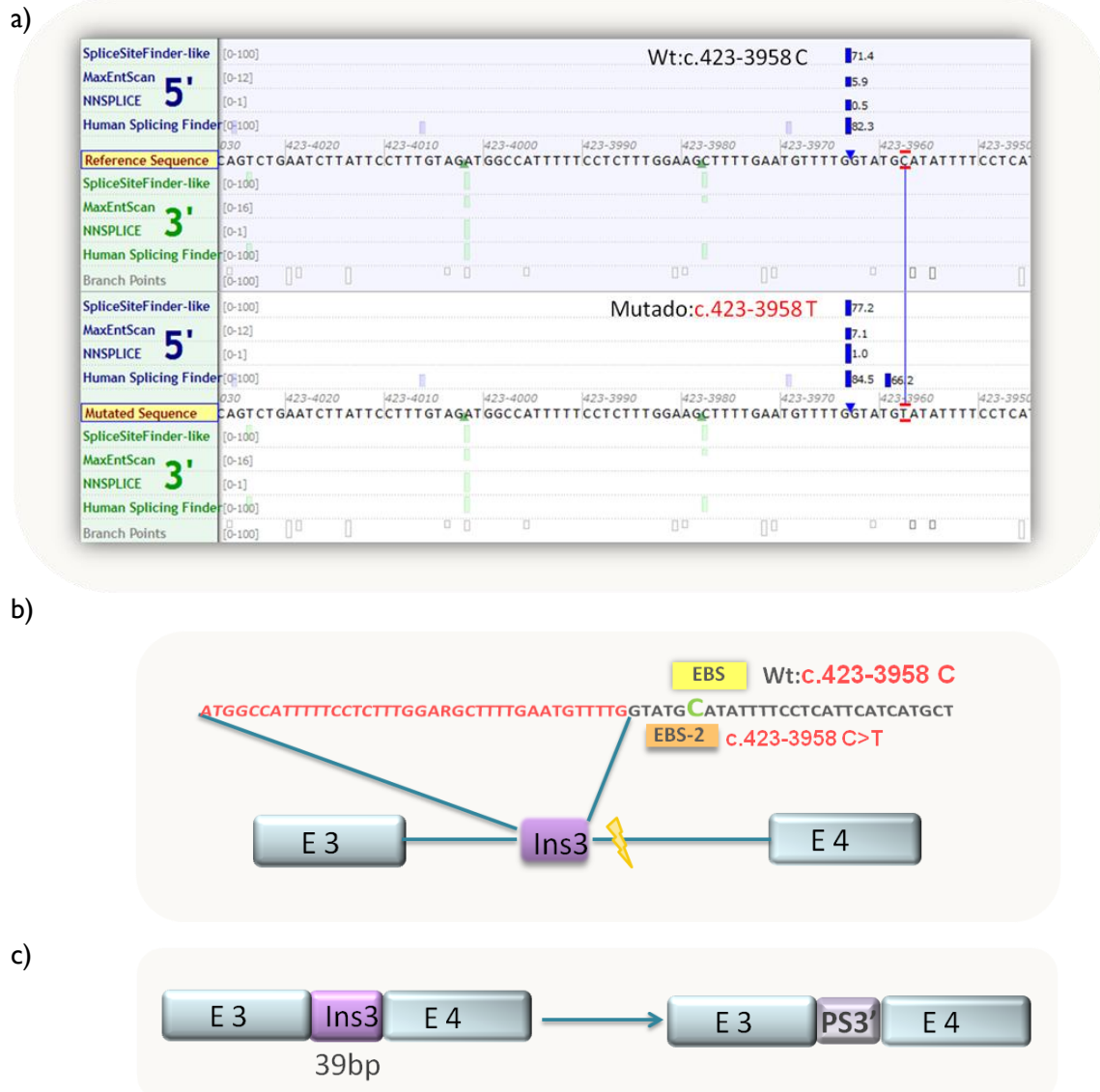
**Figura R12:** Esquema de la secuencia y localización del inserto identificado a nivel de cDNA en la Familia I05C. En amarillo se resalta el nucleótido c.423-3958 C>T.

Dicha variante no aparece descrita en la base de datos pública *1000 genomes*. Por otra parte los programas de predicción de procesamiento de mensajero *NNSPLICE*, *Human Splicing Finder*, *MaxEntScan* y *SpliceSiteFinder-like*, sitúan un sitio críptico para el procesamiento en la G final del segmento inserto, esto es, 6 pb aguas arriba del nucleótido que cambia C>T. Cuando utilizamos la secuencia mutada en lugar de la salvaje o *wild type* en las predicciones, el valor de ese sitio críptico aumenta como se aprecia en la Figura R13, y además se crea un nuevo sitio críptico a 2 pb de distancia del cambio. Otro programa de predicción, el *ESE-Finder*, localiza nuestra variante en una secuencia hexanucleótida diana para la unión del factor SPf-55, factor que potencia el procesamiento del mensajero (Figura R13). La nueva variante provoca que aparezca una nueva secuencia hexanucleótido de unión para el factor SRp55 (Figura R13).



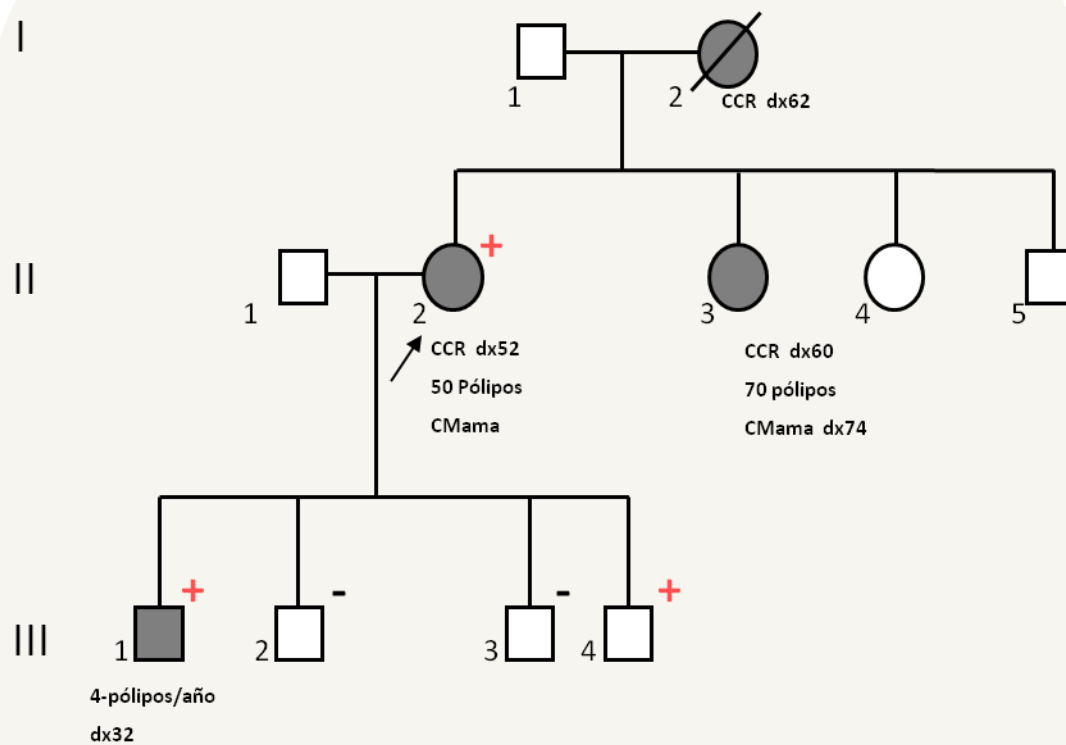
Comprobamos, en un siguiente paso, que la variante no estaba presente en una población de 818 controles.

Con estos resultados decidimos plantear el estudio de segregación en la familia. Se estudió la presencia de la inserción en dos hijos de la probando, uno diagnosticado de PAFA y otro aparentemente sano que nunca se sometió a control endoscópico. Sólo el hijo afecto mostró una secuencia con el marco de lectura aberrante en el exón 4.

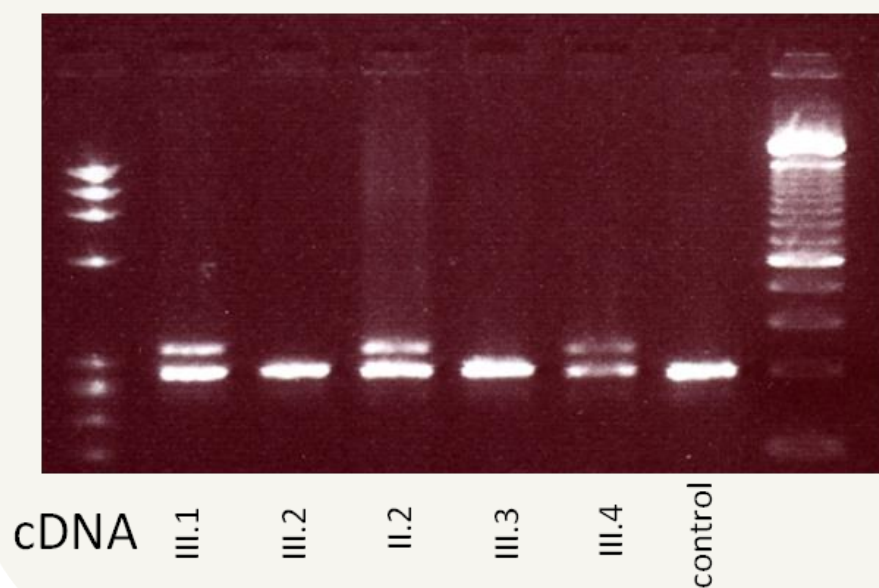


**Figura R13.** Caracterización de la variante en el intrón 3 de APC. a) Esquema de la localización del sitio críptico con respecto a la variante, con y sin el cambio. b) Esquema de la secuencia de 39 pb del intrón 3 del gen APC que se inserta mediante un procesamiento alternativo erróneo (Ins3). En verde se marca el nucleótido que cambia C>T. En amarillo se marcan la localización de la secuencia diana para el factor SRp55 factores de procesamiento alternativo (*enhancers binding site* EBS); en naranja se muestra la nueva secuencia diana para el factor SRp55(EBS-2) debido a la presencia de la variante. c) La consecuencia es la adquisición de un nuevo pseudoexón (Ins3) de 39 pb entre los exones E3 y E4 del gen APC.

a)



b)

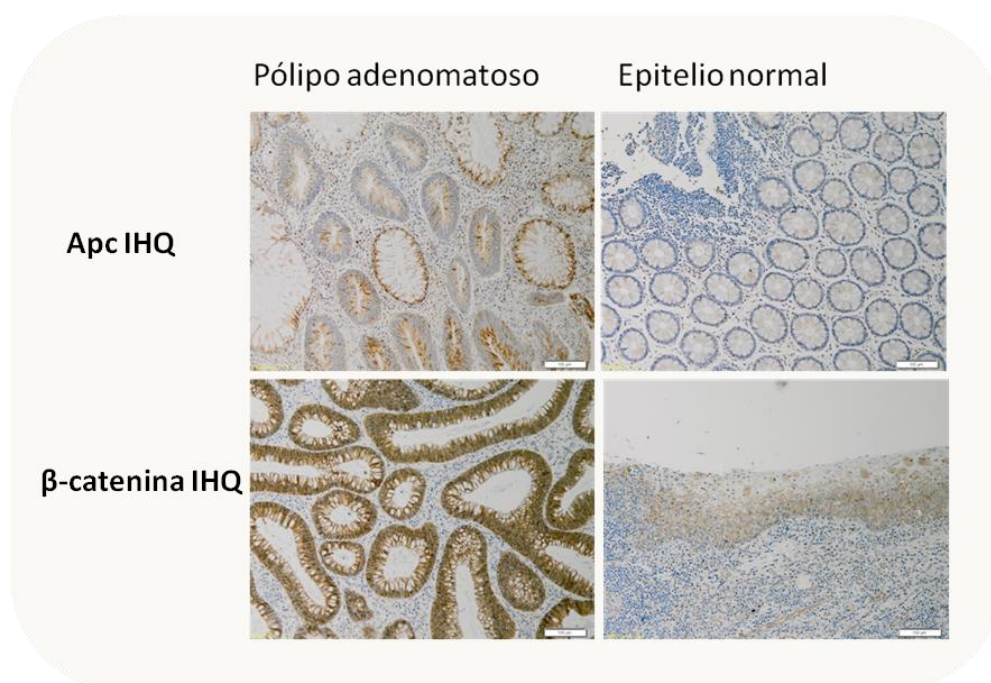


**Figura R14.** Segregación de la variante en el intrón 3 de APC a) Árbol de la Familia 105C portadora de la variante. b) Segregación de la presencia de dos transcritos en mRNA en los individuos III.1, II.2 y III.4, portadores de la variante intrónica.

Se estudió también la presencia de la variante intrónica en línea germinal en los cuatro hijos del probando. El individuo III.1 (Figura R14) portador de la inserción, resultó portador de la variante; el individuo III.2 no portador de la inserción y sano resultó no portador de la variante. Los individuos III.3 y III.4, aparentemente sanos, pero que no se someten a colonoscopia resultaron uno portador y otro no portador. Para comprobar la segregación se repitió el estudio de cDNA en los cinco individuos. En la Figura R14, se muestran las correlaciones entre los portadores de la variante a nivel intrónico y resultados de la amplificación del cDNA donde se ven los dos amplicones de distinto tamaño. Dado que el inserto es de 39 pb produce un desajuste en el marco de lectura que inevitablemente conlleva a un transcrito aberrante.

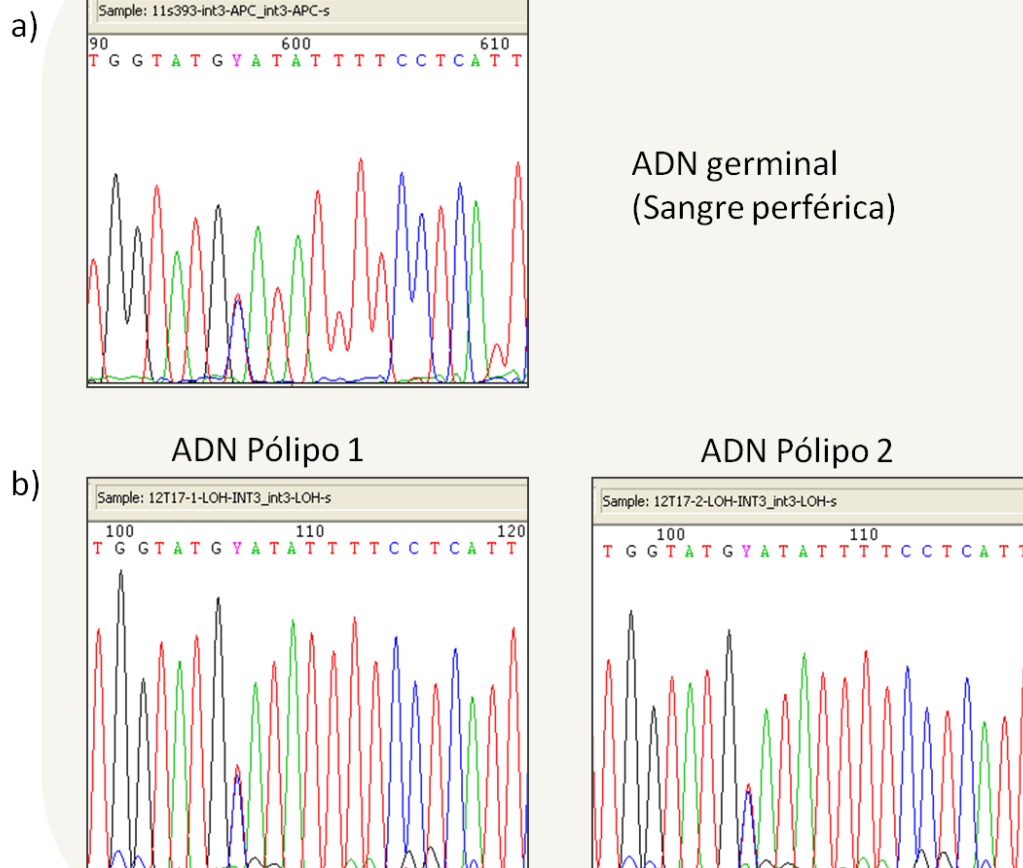
### 2.2.2 Estudio de expresión inmunohistoquímica de $\beta$ -catenina y APC en pólipos. Estudio de LOH.

Afortunadamente dispusimos de material polipoideo del hijo del probando (III.1, Figura R14). Se realizó un estudio inmunohistoquímico de  $\beta$ -catenina y Apc. Ambas proteínas mostraron un patrón de expresión aberrante.  $\beta$ -catenina estaba sobreexpresada y Apc mostraba mayor intensidad de tinción en las glándulas adenomatosas comparado con el epitelio normal.



**Figura R15.** Estudio Inmunohistoquímico de  $\beta$ -catenina y Apc en el pólipo adenomatoso y tejido normal. Los anticuerpos usados se describen en la Tabla S5 del Material Suplementario.

Se realizó también un estudio de pérdida de heterocigosidad (LOH) en dos pólipos adenomatosos del individuo III.1 (Figura R14). Ninguno de los dos pólipos mostró LOH (Figura R16).



**Figura R16.** Cromatograma de una sección de secuencia del intrón 3 de APC en ADN germinal y ADN perteneciente a los pólipos de un afecto de la Familia 105C

- a) Secuencia correspondiente a ADN germinal de sangre periférica del paciente. Presencia de la variante c.423-3958C>T
- b) Secuencias correspondientes a ADN de dos pólipos adenomatosos del paciente. Presencia de la variante c.423-3958C>T

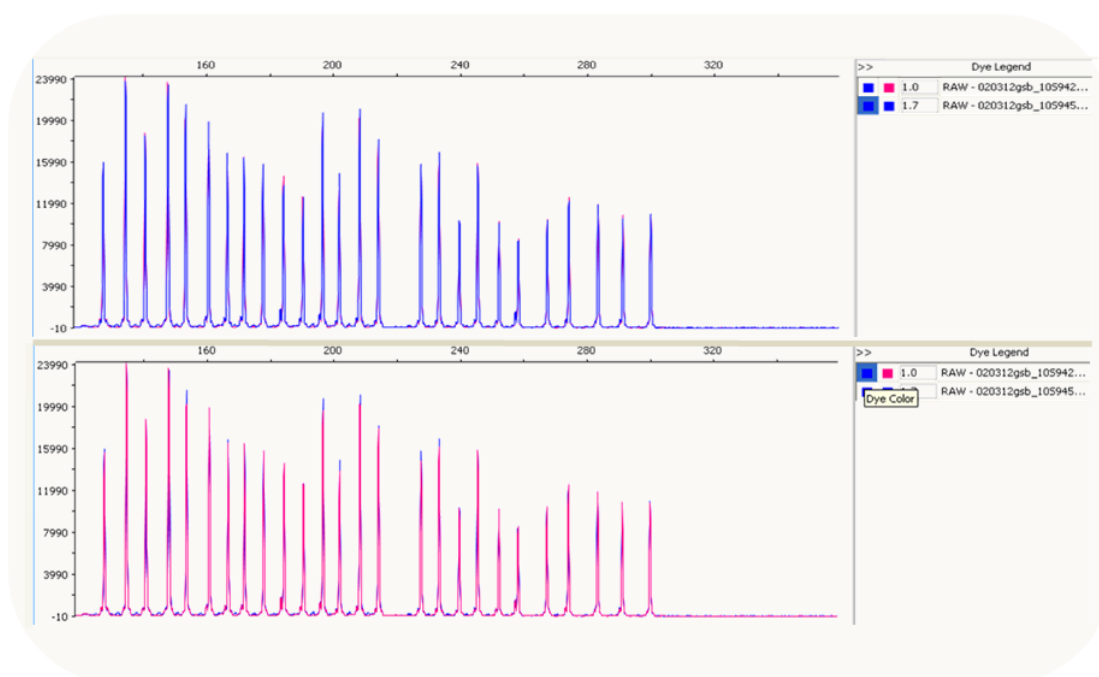
## 2.3 Estudio del gen *MUTYH*

### 2.3.1 Estudio de mutaciones puntuales del gen *MUTYH*

A pesar de que el 82% de las mutaciones encontradas en el gen *MUTYH* son Y165C y G382D, también conocidas como mutaciones recurrentes, decidimos extender el estudio analizando la secuencia completa del gen. No se encontraron mutaciones bialélicas, sólo dos variantes de significado incierto en heterocigosis.

### 2.3.2 Estudio de grandes reordenamientos del gen *MUTYH*

Por otra parte, para completar el estudio del gen *MUTYH*, se estudiaron los grandes reordenamientos del gen mediante la tecnología del MLPA. Se estudiaron 16 casos en total excluyéndose aquellas familias que seguían patrones de herencia claramente dominantes. No se encontró ningún reordenamiento del gen *MUTYH*.



**Figura R17.** Diagrama de sondas MLPA del gen *MUTYH* para una de las muestras problema (rojo) comparado con un control normal (azul).

## RESULTADOS III

### 3. ESTUDIO DE OTROS GENES WNT

En este punto en 11 de nuestras 28 familias APC/MUTYH negativas habíamos conseguido encontrar la alteración causal de la enfermedad. Así en las 17 familias restantes y una vez descartada la implicación de los genes *APC* y *MUTYH*, decidimos abordar el objetivo tercero, valorando la implicación de otros genes con papeles relevantes en la ruta Wnt. Este estudio se centró en los genes *AXIN2* y *GSK3B*.

#### 3.1. Estudio del gen *AXIN2*

El estudio del gen *AXIN2* se realizó inicialmente en 24 familias (debido a un solapamiento en el tiempo de los experimentos, el estudio de *AXIN2* comenzó con anterioridad a la finalización de todos los estudios en *APC*). En dos de ellas se encontró el SNP rs35415678 publicado como la variante Leu788 asociada a oligodontia (Mostowska 2006). Además se encontró la variante c.1387C>T; p.R463C en un caso familiar de poliposis atenuada (Familia 677C, Tabla R3, Figura R19 y Figura 9 del Anexo I). El probando portador de la variante lleva años en seguimiento por sus antecedentes personales y familiares de cáncer colorrectal. Con 31 años desarrolló 10 pólipos adenomatosos, y, 11 años después, se sometió a colectomía parcial debido a un carcinoma colorrectal. En las colonoscopias anuales de seguimiento le diagnostican 1-2 pólipos adenomatosos, aproximadamente, en cada ocasión. Su hermana fue diagnosticada de 30 pólipos y un adenocarcinoma *in situ* a los 36 años de edad, mientras que su padre falleció debido a un cáncer colorrectal (CCR) con 51 años. Ninguno de los miembros de la familia desarrolló manifestaciones extracolónicas asociadas a la PAF, y se descartó en la familia oligodontia y otros signos de displasia ectodérmica.

##### 3.1.1. Validación de la patogenicidad de la variante c.1387C>T

La variante c.1387C>T está localizada en el exón 5 del gene *AXIN2*, en el dominio de unión a  $\beta$ -catenina. En primer lugar, realizamos una búsqueda en las bases de datos públicas *1000 Genomes* y *NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) database*. En ninguna de ellas aparece descrita la variante. Con objeto de tratar de confirmar su patogenicidad, recurrimos al programa informático *Polyphen* que la clasificó como *possibly damaging* con un score de 0.69 (0-1). Tanto el nucleótido como el dominio en el que se localiza, están altamente conservados en la evolución.

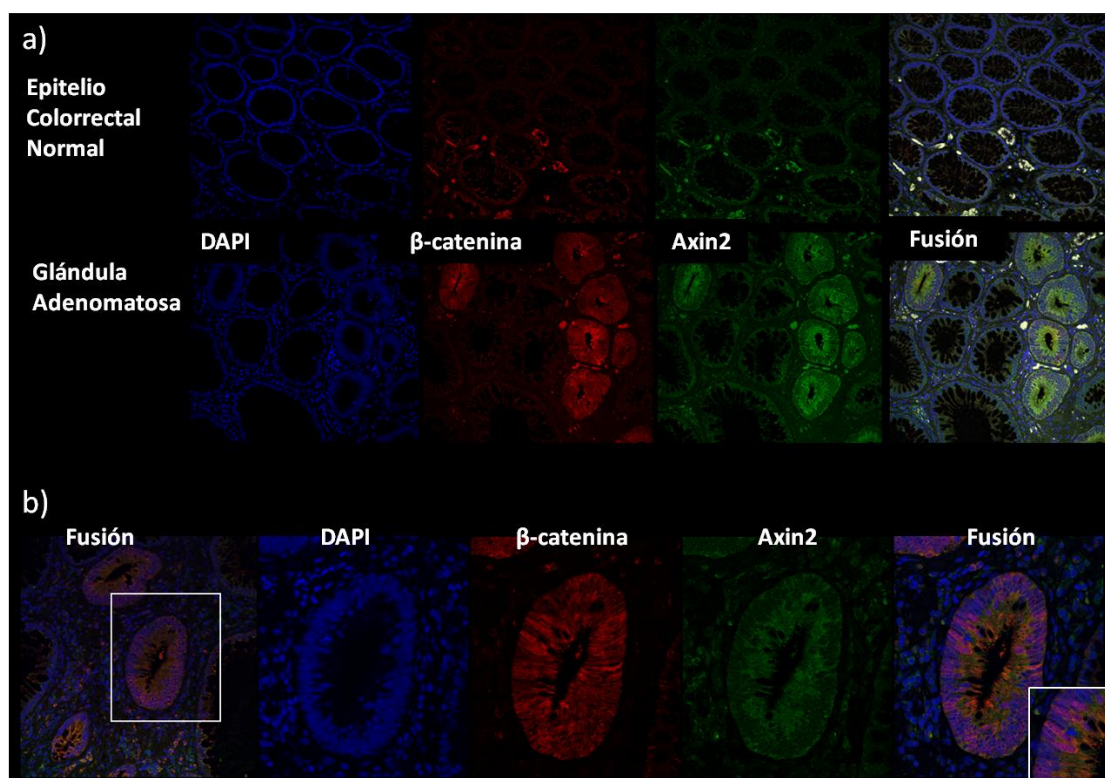
En segundo lugar, llevamos a cabo estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH) en un adenoma del probando y dos adenomas y dos pólipos hiperplásicos de su hermana (III-3, Familia 677C, Figura R19 y Figura 9 del Anexo I).



Se identificó LOH en el pólipo del probando y en un pólipo hiperplásico y un adenoma de su hermana. Desafortunadamente no dispusimos de tejido del CCR para este estudio de LOH.

Posteriormente se realizó un estudio inmunohistoquímico e inmunofluorescente (IF) para valorar el patrón de expresión de las proteínas Axin2 y  $\beta$ -catenina en el adenoma del probando y en el pólipo hiperplásico de su hermana. En comparación con el tejido normal del mismo paciente, los pólipos mostraron altos niveles de acumulación de ambas proteínas.

Mediante una tinción doble en IF se realizó un estudio de co-localización de las proteínas en el tejido polipoide y su control normal. Axin2 se acumula en exceso en el citoplasma de las células que forman la glándula adenomatosa, mientras que la  $\beta$ -catenina se acumula en la membrana y el núcleo confirmando así la no co-localización de ambas proteínas.

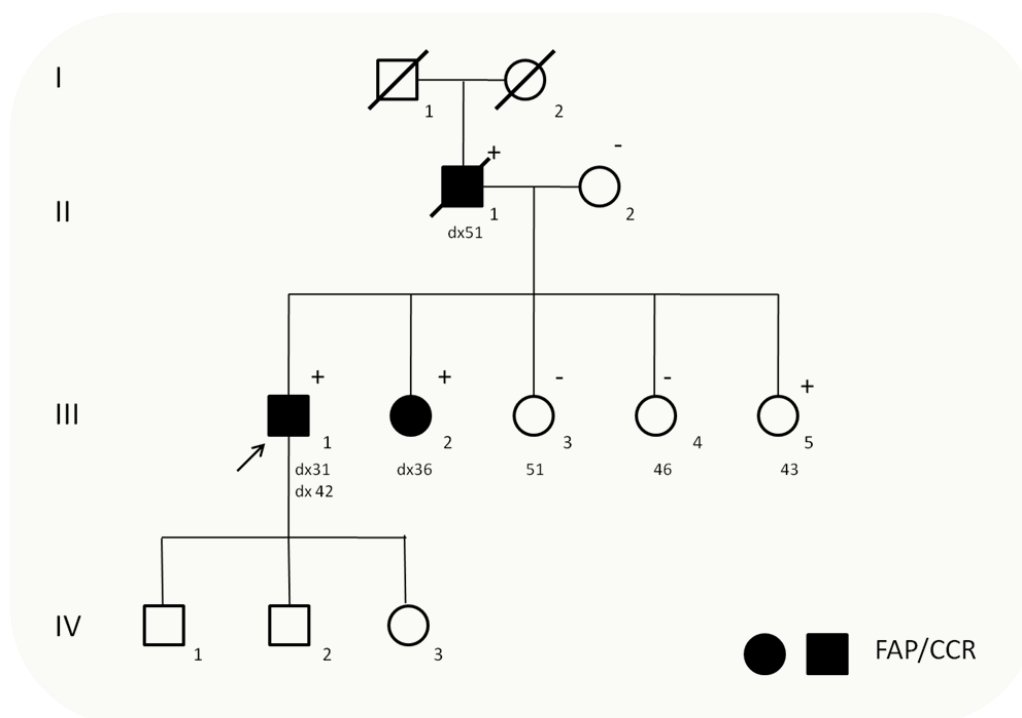


**Figura R18.** Estudio con inmunofluorescencia de las proteínas  $\beta$ -catenina y Axin2. a) Sobreexpresión de ambas proteínas comparado con su tejido normal pareado. b) Confirmación de la no-colocalización de ambas proteínas. Axin2 se acumula en el citoplasma mientras que  $\beta$ -catenina se acumula en el núcleo de las células.

Para finalizar el estudio se analizó una población de 800 controles españoles, en los que no se encontró la variante.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos llevar a cabo un estudio de segregación en la familia. Para investigar el origen de la variante estudiamos el ADN de la madre del probando de 82 años de edad que resultó no ser portadora. Posteriormente se estudió a su hermana afecta (III.2, Figura R19) que resultó ser portadora, lo que nos permitió deducir que el padre fallecido a los 51 años de un CCR era portador obligado. La familia fue informada de estos resultados y las tres hermanas aparentemente asintomáticas manifestaron su deseo de ser estudiadas. Dos de ellas (III-4 y 5, Familia 677C, Figura R19), de 51 y 46 años respectivamente resultaron ser no portadoras. Ambas se realizaban colonoscopias periódicas de control y en ninguna de ellas se identificaron pólipos.

La tercera hermana (III-5, Figura R19) resultó portadora de la variante. En la actualidad tiene 43 años, se le proporcionó consejo genético y se sometió a colonoscopia que resultó normal.

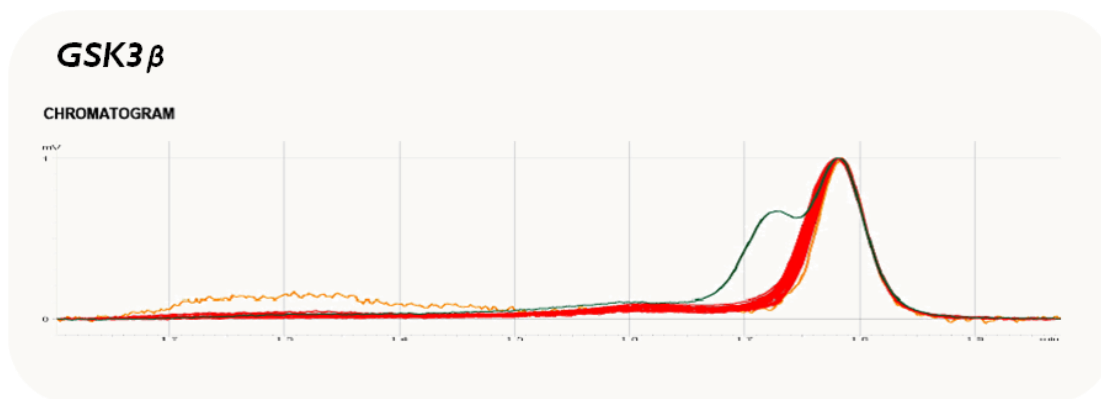


**Figura R19:** Árbol de la familia 677C, portadora de la variante en AXIN2.

### 3.2. Estudio del gen *GSK3β*

El estudio del gen *GSK3β* se realizó en 24 familias. En un caso familiar de PAF (Familia 0373-00C, Figura 12 del Anexo I) se encontró la variante no descrita previamente: c.950G>T;p.Val317Phe (Figura R20).





**Figura R20:** Análisis mediante dHPLC del exón 10 del gen *GSK3β* en las 24 familias. Se muestra el gráfico de datos del análisis por dHPLC en el que se detecta una variante (verde) en uno de las muestras estudiadas.

### 3.2.1. Validación de la patogenicidad de la variante c.950G>T en *GSK3*

En primer lugar se usaron las bases de datos públicas *1000 Genomes* que no proporcionó ningún registro de esta variante y *NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) database* en la que se encontró la presencia de la variante en 1 alelo de 4518 analizados para ese cambio. Por lo que aparentemente no se trataba de una variante común.

En segundo lugar usamos los programas de predicción *Polyphen2* y *SIFT* que la consideran como “*probably damaging*” (score: 0.989) y “*truncating*” (score: 0) respectivamente.

En un tercer intento por mejorar el conocimiento de la variante, utilizamos otros programas de predicción:

- *Mutation Assessor*, clasifica la variante como “medium” en cuanto a la posibilidad de estar asociada a la enfermedad.
- *SNPs&GO*, que considera la variante como patogénica (índice de fiabilidad=1).

La variante se localiza en el dominio quinasa de la proteína provocando un cambio de volumen e hidrofobicidad de la misma aunque sin localizarse en un sitio activo conocido según las bases de datos Uniprot y FireDB.

En cuarto lugar procedimos a estudiar una población de 820 controles, no apareciendo la variante en ninguno de ellos. El probando es un varón diagnosticado de poliposis a los 24 años de edad en el que se identificaron osteomas. La madre y la abuela del probando fallecieron afectas de PAF.

## RESULTADOS IV

### 4. ESTUDIO DE GENES QUE NO PERTENECEN A LA VÍA WNT

Uno de los últimos objetivos de esta tesis consistía en descartar la implicación de otros genes no involucrados en la vía Wnt. Debido a la reciente publicación de dos casos de poliposis intestinal y aneuploidía variegada en mosaico aparentemente asociadas a mutaciones en los genes *BUB1B* Y *BUB1* (Rio Frio 2010; de Voer 2011) de la vía “*Spindle Assembly Checkpoint*”, decidimos abordar el estudio en algunos de nuestros pacientes que seguían siendo negativos para todos los estudios anteriormente descritos. Como todos los casos descritos mostraron aneuploidía variegada en mosaico decidimos explorar la implicación de los genes SAC mediante la realización de un cariotipo.

#### 4.1. Cariotipado de pacientes

De los cinco pacientes cariotipados, cuatro fueron claramente negativos. En un caso, Familia 965C, con una herencia aparentemente recesiva, observamos 5 de 20 metafases con alteraciones. Cuatro de veinte metafases mostraron aneuploidías del cromosoma X (4/20) y la quinta alteración consistía en una translocación  $t(1;3)$ . Ante estos resultados decidimos repetir el cariotipo, pero no encontramos alteraciones en este segundo estudio por lo que se consideró que las alteraciones en el primer estudio podrían ser artefactos del cultivo.

Este individuo, además, es portador de la variante localizada en la posición 1203 del 3'UTR de *APC*

#### 4.2. Expresión Inmunohistoquímica de Bubr1.

Dentro del estudio de los genes de la vía SAC llevamos a cabo un análisis de la expresión inmunohistoquímica de la proteína Bubr1 en un array de tejidos (TMA) constituido por pólipos de los pacientes. Estos se resultados se detallan en el apartado de Resultados V correspondiente a al perfil inmunohistoquímico de los pólipos adenomatosos.

## RESULTADOS V

### 5. PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS PÓLIPOS ADENOMATOSOS

#### 5.1. Agrupamiento no supervisado de las muestras

En este apartado de resultados se describen los perfiles de expresión IHQ de 29 proteínas implicadas en el CCR valoradas en un *array* de tejidos (TMA) mediante un estudio inmunohistoquímico (IHQ). En el TMA se incluyeron muestras de pólipos adenomatosos y CCR de los casos *APC/MUTYH* negativos (N=21), para compararlos con pólipos adenomatosos y CCR de pacientes con mutaciones conocidas en los genes *APC* (N=27) y *MUTYH* (N=10). Además se incluyeron una serie de pólipos esporádicos (N=7), pólipos de pacientes con oligopoliposis (N=10) (en los que el número de pólipos por término media variaba entre 4 y 10), pólipos mixtos (N=5) y epitelios normales (N=9). De las 29 proteínas (Tabla S5 del Material Suplementario), hubo 4 cuyo marcaje resultó no valorable (*Tgfr $\beta$ 1*, *Pi3KCa*, *Hes1* y *Gstp1*).

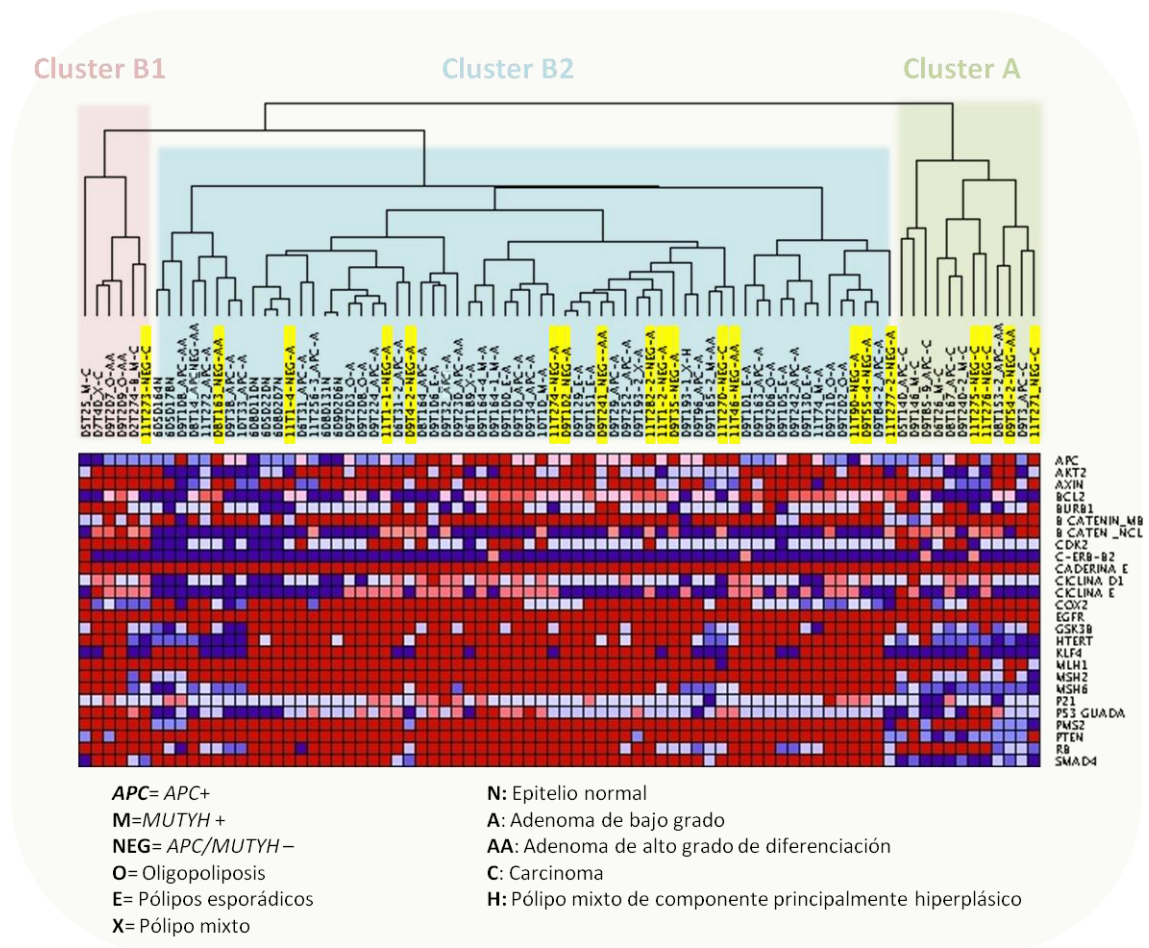
El principal objetivo de este estudio era la caracterización molecular de los distintos tipos de pólipos de acuerdo a su base genética, y, evaluar los perfiles de expresión de los pólipos de pacientes negativos en comparación al resto de pólipos.

Para descartar si las muestras se agrupaban por perfiles de expresión dependiendo de la base genética de cada paciente realizamos test de agrupamiento no supervisado con el programa *GenePattern* de *Broad Institute*.

Antes de comenzar los análisis se aplicó un filtro de validez para las muestras, eliminando de la serie aquellos casos con un porcentaje de valores perdidos o no valorables mayor al 25% en la serie de marcadores. El perfil de expresión y el agrupamiento de las muestras se reflejan en las Figuras R21, R22 y R27.

El primer análisis no supervisado de agrupamiento de las muestras corresponde al diagrama (*HeatMap*) de la Figura R21. Como puede observarse, los pólipos se distribuyen homogéneamente sin estar condicionados por su base genética, a excepción de un pequeño grupo (B1) en el que no hay muestras *APC* positivas.

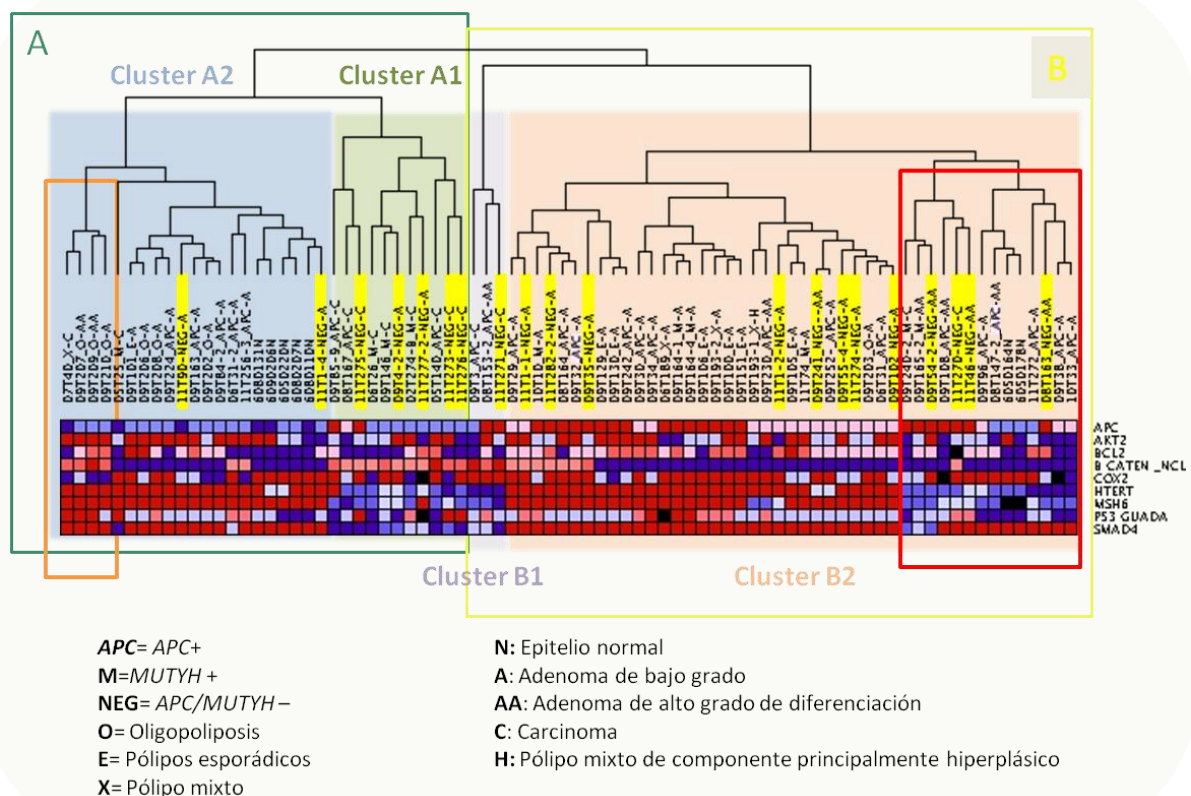
A pesar de esta distribución en la que se mezcla las distintas categorías de pólipos, en este análisis no supervisado se obtienen dos grupos claros que responden al estadio de cada muestra.



adenomas de bajo grado de diferenciación y los epitelios normales, vuelve a mantenerse la homogeneidad en la distribución de todos los tipos “genéticos” de pólipos.

Para confirmar qué marcadores son los más relevantes en el agrupamiento no supervisado de las muestras y a la vez conseguir un resultado más ajustado y con menos ruido en el agrupamiento, realizamos un análisis de “*sparse hirerchical clustering*” con el programa *Genepattern*. El algoritmo de este análisis agrupa las muestras en base a aquellos marcadores que tienen mayor peso para determinar la composición del dendrograma y las distancias entre una muestra y otra. La Figura R22 recoge los resultados de este análisis. Los marcadores que resultaron relevantes para este agrupamiento fueron Apc, Akt2, Bcl2,  $\beta$ -catenina nuclear, Cox2, Htert, Msh6, P53 y Smad4.

Como era de esperar y en concordancia con el análisis anterior, los pólipos de pacientes *APC/MUTYH* negativos mostraron una distribución homogénea no mostrando diferencias con los patrones de expresión del resto de pólipos.



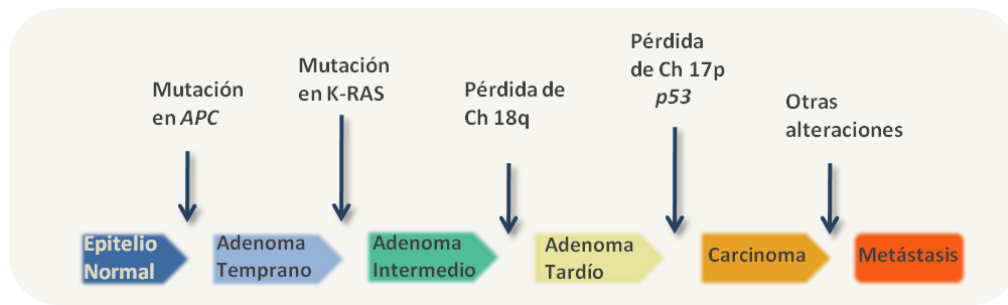
**Figura R22:** Agrupamiento no supervisado resultante de la aplicación del algoritmo *Sparse Hirerchical Clustering* que muestra los marcadores más relevantes, que definen el agrupamiento de las muestras. En vertical se muestra la serie de marcadores utilizados. En horizontal el dendrograma y la nomenclatura de cada muestra. En la nomenclatura se utilizan el número de muestra seguido de un guión con un código que representa el tipo de pólipo según el componente genético o su histología. Los códigos se detallan en la leyenda de la Figura. En amarillo se resaltan los casos negativos, objeto de este trabajo.

Se perfilan dos grupos bien diferenciados según la expresión o no de la proteína Apc. El grupo A (no expresa Apc, o lo hace en bajo grado), engloba de nuevo todos los carcinomas (subgrupo A1 en verde), a excepción de dos, y un conjunto de pólipos y epitelios normales (subgrupo A2 en azul). El subgrupo A2 reúne todas las oligopoliposis, excepto un caso; además dentro de este subgrupo A2, vuelve a aparecer el pequeño conjunto caracterizado por la falta de expresión de Apc y Cox2 formado por tres muestras de oligopoliposis y un pólipo mixto (recuadrado en naranja).

El grupo B concentra la mayor parte de los adenomas de bajo grado de diferenciación, pero también la mayoría de los adenomas de alto grado (9/11) siendo la característica principal del *cluster* B la alta expresión de Apc en prácticamente la totalidad de las muestras que lo componen (40/45). Así mismo, puede dividirse en 2 subgrupos: el pequeño subgrupo B1 (en lila en la Figura R22) podría considerarse intermedio entre los *clusters* A y B, formado tan solo por tres muestras (dos carcinomas y un adenoma de alto grado de diferenciación), con un patrón de expresión muy similar al *cluster* A pero con altos niveles de expresión de Htert. Por su parte el subgrupo B2 (en rosa en la Figura R22) está formado en parte por los adenomas con displasia epitelial de alto grado de diferenciación (recuadrados en rojo) que aún conservan la expresión de Smad4 pero han perdido Htert y Msh6 y por el resto de adenomas tempranos o adenomas con displasia epitelial de bajo grado.

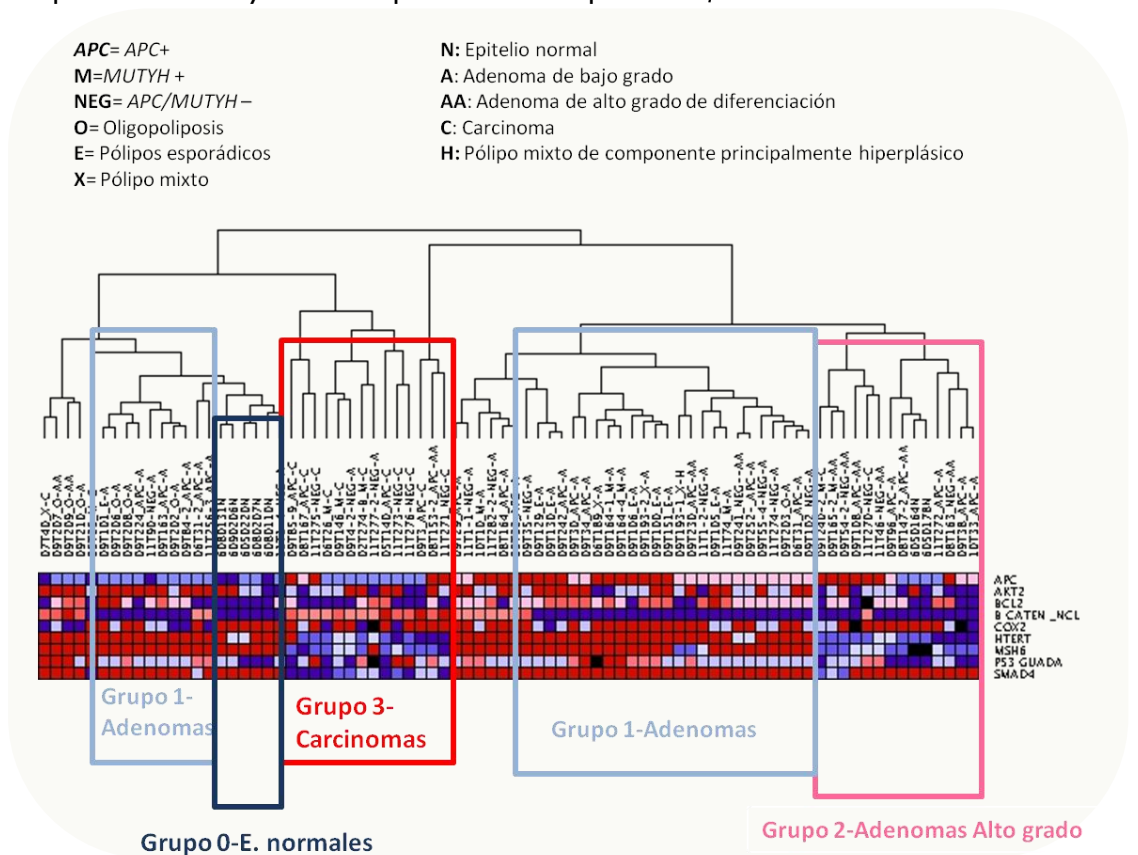
### **5.2.1. Agrupamiento no supervisado y comparación supervisada entre los perfiles IHQ de epitelios normales, adenomas y adenocarcinomas**

A pesar de que nuestro objetivo principal, identificar un patrón inmonohistoquímico peculiar para los casos negativos, no ha tenido los resultados esperados, el análisis jerárquico no supervisado de las muestras nos proporcionó un agrupamiento respondiendo a la secuencia de progresión adenoma –carcinoma descrita por Fearon y Volgenstein en 1990. Dado que este aspecto no se incluía en los objetivos iniciales de esta tesis y, por tanto, no se ha incluido información de este modelo en el apartado de Introducción, la figura R23 recoge una ilustración esquemática del citado modelo. Así para que la transformación de un epitelio normal hacia adenoma temprano tenga lugar es necesaria en primer lugar la inactivación de Apc pero también seguida de la adquisición de otras alteraciones. Mutaciones en el oncogen Kras y las pérdidas alélicas de los cromosomas 18q y 17p (que implica la falta de función en p53), marcan el desarrollo de un adenoma temprano en su evolución hasta carcinoma (Figura R23).



**Figura R23:** Esquema representativos de las alteraciones en la transición de un epitelio normal hacia un adenocarcinoma. Adaptado de Fearon y Vogelstein (1990).

Del mismo modo pudimos asignar a los distintos subgrupos de nuestra muestra un estadio según sus patrones de expresión independientemente de su base genética. El modelo de progresión comienza desde los epitelios normales (grupo 0 en la Figura R24), caracterizados por expresión nula o basal de p53, APC y  $\beta$ -catenina nuclear y expresión máxima de Smad4, Msh6. En el siguiente escalón, grupo I y IB, estarían representados los pólipos de bajo grado de diferenciación que comienzan a acumular Akt2, Bcl2, p53 y por último Apc y  $\beta$ -catenina nuclear. En el grupo 2 estarían los adenomas de alto grado de diferenciación en los que aún se conserva la expresión de Smad4 y por últimos los carcinomas en los que se ha perdido la expresión de la mayoría de las proteínas a excepción de  $\beta$ -catenina nuclear.



**Figura R24:** Patrones de expresión de las distintas muestras contenidas en el TMA conforme a la secuencia adenoma-carcinoma de carcinogénesis colorrectal.

### 5.2.2 Marcadores de progresión adenoma –adenocarcinoma.

Para completar este estudio y corroborar los resultados mediante valores estadísticos se realizaron *test Chi2* de *Pearson* enfrentando los adenomas de bajo grado frente a los de alto grado y adenocarcinomas. Los marcadores que caracterizan cada estadio se representan en la Tabla R6.

Los cambios más significativos se producen en la transición de mucosa normal a adenoma de bajo grado de diferenciación; *Apc*, *Bcl2*, *Cdk2*, *Ciclina D1*, *Gsk3 $\beta$* , *Htert* y *p53* están claramente sobreexpresadas en los adenomas con displasia epitelial de bajo grado. *Pms2*, *Ciclina E* y *Msh2* muestran una tendencia a la acumulación en estos adenomas con displasia de bajo grado (Los resultados de este análisis se detallan en el apartado de Test Estadísticos del Anexo I).

En el segundo paso de la transición adenoma-carcinoma (N-A-AA-C), que va desde la evolución de un adenoma de bajo grado a uno de alto grado de diferenciación los cambios más importantes se producen a nivel de la expresión de *Gsk3 $\beta$*  y *Htert* que aparecen ahora subexpresados confirmando así que la sobreexpresión de estos dos marcadores es específica del adenoma con displasia epitelial de bajo grado. La proteína reparadora *Msh6* cobra un papel importante y muestra una subexpresión en el adenoma tardío o de alto grado. A menor escala puede observarse una tendencia a la subexpresión de *p21* y las también reparadoras, *Pms2* y *Msh2* (Los resultados de este análisis se detallan en el apartado de Test Estadísticos del Anexo I).

El paso evolutivo de adenomas tardíos a carcinomas muestra características claras en nuestra serie que viene definidas primeramente por la pérdida de expresión de la proteína Krüppel-Like Factor 4, *Klf4*, que es un factor de transcripción que regula la progresión celular y cuya expresión máxima tiene lugar en las células del epitelio gastrointestinal.

La falta de expresión de *Smad4* y en menor medida de *Bcl2*, parecen también características en la adquisición del estadio de carcinoma. Por último la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina con localización nuclear termina por definir el último paso hacia la malignización del epitelio gastrointestinal. Los resultados de este análisis se detallan en el apartado de Test Estadísticos del Anexo I.

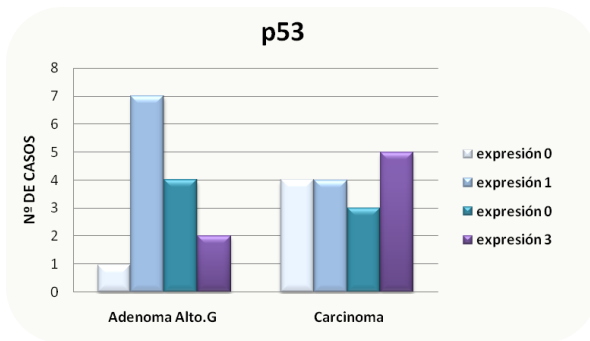
Uno de los principales eventos que tiene lugar en la secuencia de evolución de adenoma tardío a carcinoma descrita por Fearon y Volgestein es la inactivación de *p53*. En nuestros resultados no encontramos cambios significativos en la expresión de dicha proteína entre los adenomas tardíos y los carcinomas. Sin embargo, cabe señalar que *p53* apareció sobreexpresado en adenomas de bajo grado comparado con mucosa normal. Y, al comparar



adenomas tardíos (adenomas con displasia epitelial de alto grado), con carcinomas la tendencia fue distinta como puede observarse en la gráfica de la Figura R25. Por ello comparamos adenomas con displasia de bajo grado y carcinomas obteniendo un valor estadístico de  $p=0,02$  lo que nos confirmó la tendencia de cambio en la expresión de p53 según se evoluciona en la transición de adenoma a carcinoma.

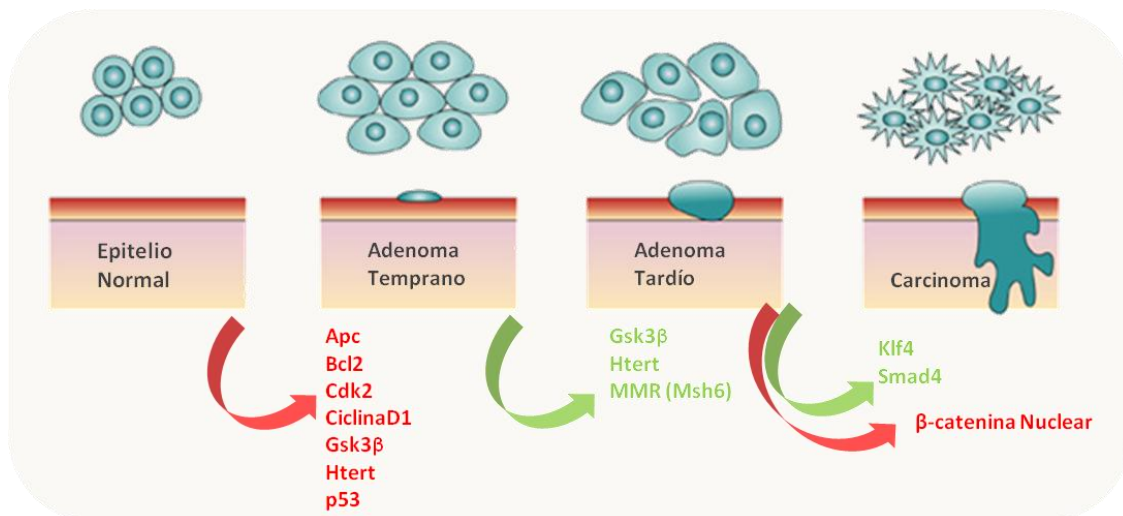
TRANSICIÓN		Epitelio normal(N) /Adenoma bajo grado (A)	Adenoma bajo grado/ Adenoma de alto grado (AA)	Adenoma de alto grado / Adenocarcinoma(C)
Proteína	Apc	<i>p= ,000</i>	<i>p= 0,107</i>	<i>p= 0,130</i>
	Bcl2	<i>p= ,000</i>	<i>NS</i>	<i>p= 0,032</i>
	b-catenina N	<i>NS</i>	<i>p= 0,199</i>	<i>p=0,034</i>
	cdk2	<i>p= ,000</i>	<i>NS</i>	<i>p= 0,90</i>
	Ciclina D1	<i>p= ,000</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
	Ciclina E	<i>p= 0,038</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
	Cox2	<i>p= 0,086</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
	Gsk3b	<i>p= 0,007</i>	<i>p= 0,001</i>	<i>NS</i>
	Htert	<i>p= 0,001</i>	<i>p= 0,002</i>	<i>NS</i>
	Klf4	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>p= ,000</i>
	Msh2	<i>p= 0,018</i>	<i>p= 0,059</i>	<i>NS</i>
	Msh6	<i>NS</i>	<i>p= 0,003</i>	<i>NS</i>
	p21	<i>NS</i>	<i>p= 0,022</i>	<i>NS</i>
	p53	<i>p= 0,009</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
	Pms2	<i>p= 0,027</i>	<i>p= 0,050</i>	<i>NS</i>
	Pten	<i>NS</i>	<i>p= 0,094</i>	<i>NS</i>
Smad4	<i>NS</i>	<i>p= 0,152</i>	<i>p= 0,002</i>	

**Tabla R6:** Listado de proteínas diferencialmente expresadas en las transición desde los epitelios normales a los adenocarcinomas colorrectales. En rojo se muestran las proteínas que aparecen sobreexpresadas en la transición adenoma-carcinoma (N-A-AA-C), en verde las que se subexpresan.



**Figura R25:** Distribución de los niveles de expresión de p53 en adenomas de alto grado de diferenciación (AA) y carcinomas (C).

En la figura R26 se muestra un esquema de la adquisición de alteraciones que definen cada paso del estadio en nuestra muestra:



**Figura R26:** Esquema de los principales marcadores sobreexpresados (rojo) y subexpresados (verde) que caracterizan cada estadio en la progresión desde los epitelios normales hasta los carcinomas.

### 5.3 Agrupamiento no supervisado de los adenomas tempranos y tardíos

En un intento por caracterizar más adecuadamente los pólipos *APC/MUTYH* negativos, eliminamos del análisis los carcinomas de todas las categorías ya que estaban claramente determinando el agrupamiento y sesgando los resultados.

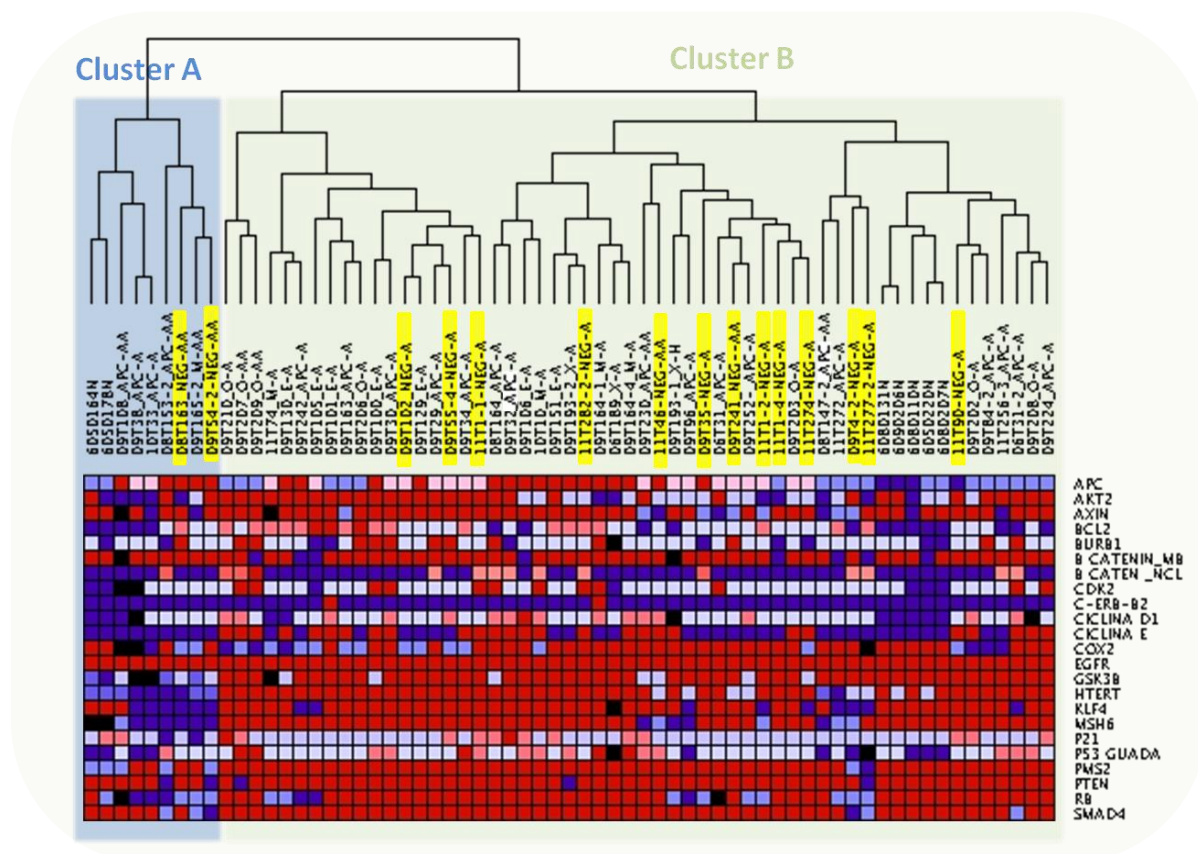
La Figura R27 muestra el análisis no supervisado de 65 adenomas, utilizando sólo aquellos marcadores relevantes en el agrupamiento de las muestras. Si bien los casos negativos se distribuyen homogéneamente a lo largo de toda la muestra (resaltados en amarillo en la Figura), mezclándose con los otros tipos de adenomas, cabe destacar que la gran mayoría de ellos (11/15) sobreexpresan Apc.

Para profundizar más en el panel de expresión de Apc, evaluamos su perfil de expresión en los distintos pólipos de la serie. Las muestras de epitelio normal muestran falta de expresión o expresión en grado uno, lo que podríamos llamar niveles basales de Apc. Con la excepción de las oligopoliposis, en las que todos los casos menos uno (85,7%) mostraban nivel 1 o

basal de expresión de la proteína Apc, en la gran mayoría del resto de tipos de pólipos se detectaron niveles de expresión 2 y 3.

Centrándonos en nuestro grupo de interés, el 73,3% (11/15) de los casos negativos mostró una sobreexpresión de la proteína Apc, porcentaje similar al 66,6% (14/21) detectado en los casos con mutación germinal en *APC*. La expresión en función del estadio del pólipo, temprano o tardío, también fue similar en los casos negativos y en los *APC* positivos.

Una vez más en el agrupamiento jerárquico no supervisado, los dos grupos que más claramente se diferencian, en la Figura R27, vienen determinados por el grado de desarrollo histológico. Así, el *cluster* A formado principalmente por adenomas de alto grado de diferenciación se caracteriza por la pérdida de expresión de Msh6, Gsk3 $\beta$  y Htert; mientras que el más numeroso grupo B que comprende la gran mayoría de los adenomas de bajo grado y epitelios normales está caracterizado por mantener la expresión de estas tres proteínas (Msh6, Gsk3 $\beta$  y Htert).

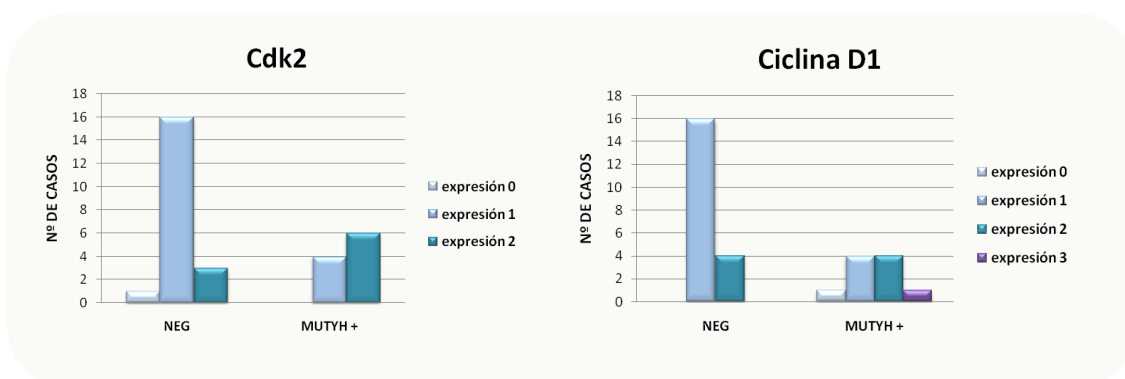


**Figura R27:** Agrupamiento jerárquico del conjunto de los adenomas. Agrupamiento no supervisado resultante de la aplicación del algoritmo *Sparse Hierarchical Clustering* elaborado sólo con los marcadores más relevantes para el agrupamiento de las muestras. En vertical se muestra la serie de marcadores utilizados. En horizontal el dendrograma y la nomenclatura de cada muestra. En la nomenclatura se utilizan el número de muestra seguido de un guión con un código que representa el tipo de pólipo. En amarillo se resaltan los pólipos *APC/MUTYH* negativos objeto de este trabajo.

#### 5.4 Comparación supervisada de los pólipos según su base genética

Aunque como se ha visto en los resultados previos, los pólipos negativos no parecían agruparse diferencialmente en ninguno de los análisis no supervisados, decidimos hacer una comparación supervisada grupo a grupo tratando así de identificar posibles diferencias entre los pólipos *APC/MUTYH* negativos y el resto de grupos de pólipos. Comparamos individualmente los negativos con los *APC* y *MUTYH* positivos, los pólipos esporádicos y las oligopoliposis. Los resultados de este análisis se muestran en el Apéndice II del Material Suplementario de esta tesis.

En primer lugar realizamos la comparación entre los casos negativos y los *APC* positivos en su totalidad puesto que el porcentaje de carcinomas de cada grupo era similar. No observamos diferencias en la expresión de ningún marcador. En la comparación de los casos negativos y los *MUTYH* positivos, el marcador Cdk2 mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,037$ ) y Ciclina D1 mostró una tendencia ( $p= 0,086$ ), ambos aparecen subexpresados en nuestro grupo de interés (Figura R28).



**Figura R28:** Expresión de Cdk2 y Ciclina D1 en los pólipos *MUTYH* positivos (*MUTYH*+) y *APC/MUTYH* negativos (NEG). Los valores 0, 1, 2 y 3 corresponden a las categorías según los niveles de expresión de las proteínas

A la hora de buscar diferencias o similitudes entre los pólipos de pacientes oligopolipósicos y los pólipos esporádicos con nuestros casos negativos, tuvimos que aplicar un primer filtro para eliminar los carcinomas de la serie de pólipos negativos, evitando así un posible sesgo. Los resultados obtenidos se relacionan en la Tabla R7.

El resultado de *Apc* se ha explicado previamente y es debido a que el 85,7% de las muestras pertenecientes a pacientes con oligopoliposis mostraron niveles basales de expresión de *Apc*.

Casos APC/MUTYH- vs Esporádicos		Casos APC/MUTYH- vs Oligopoliposis	
<b>Akt2</b>	p= 0,115	<b>Apc</b>	<b>p= 0,017</b>
<b>Bcl2</b>	p= 0,055	<b>B-catenina N</b>	p= 0,100
<b>Ciclina D1</b>	p= 0,185	<b>Ciclina D1</b>	p= 0,138
<b>Ciclina E</b>	p= 0,172	<b>Ciclina E</b>	p= 0,069
<b>Rb</b>	p= 0,199	<b>Cox2</b>	p= 0,080
		<b>KIF4</b>	p= 0,130
		<b>p53</b>	p= 0,113
		<b>Rb</b>	p= 0,065

**Tabla R7.** Marcadores que mostraban una tendencia diferente al comparar los pólipos APC/MUTYH negativos con los pólipos esporádicos y los de pacientes con oligopoliposis. En rojo se muestra la sobreexpresión de los marcadores en el grupo de negativos con respecto al resto.

---



DISCUSIÓN





## I. MUTACIONES EN APC.

En esta tesis presentamos los resultados del estudio mutacional de *APC* y *MUTYH* en una serie de 136 familias diagnosticadas de PAF clásica provenientes de diferentes áreas del país, lo que nos ha permitido conocer mejor el espectro mutacional de *APC* en población española. La información sobre las mutaciones de *APC* en nuestra población es bastante escasa. Existen datos acerca de poblaciones del noroeste y sur del país así como de las islas Baleares. Estos estudios sugieren la existencia de diferencias con otras poblaciones (Ruiz-Ponte 2001; Garcia-Lozano 2005; Gonzalez 2005; Gomez-Fernandez 2009).

En la presente serie hemos detectado una mutación germinal en el 78,7% de los pacientes. Esta cifra aumentó hasta el 82,7% de las familias si sólo teníamos en cuenta aquellos casos con antecedentes familiares del síndrome. Esta tasa de detección se sitúa en el límite superior de los rangos descritos previamente para la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) clásica que van del 50 al 85% (Michils 2005; Cao 2006). Las proporciones de los distintos tipos de mutaciones en nuestra serie son superponibles a los proporcionados por la base de datos *Human Gene Mutation Database* (HGMD). Las mutaciones más frecuente fueron las pequeñas delecciones que representan un 40% de todas las mutaciones. Los grandes reordenamientos del gen (GR) están presentes en un 5,9% de los casos con mutación, aproximadamente la mitad del 12% descrito por Aretz *et al.* (Aretz 2005). El número de mutaciones noveles, no descritas previamente, fue de 25, que equivale al porcentaje publicado en otras poblaciones (Friedl 2001; Resta 2001; Mihalatos 2003; De Rosa 2004). Trece mutaciones aparecían en más de una familia, siendo tres de ellas eran noveles. La mutación c.3183\_3187delACAAA fue detectada en cinco familias de la presente serie. Aunque se ha descrito un posible efecto fundador de esta mutación en población balear (Gonzalez 2005), nosotros no pudimos demostrar la existencia de un haplotipo común para los casos portadores de la misma. Un resultado similar obtuvimos en los doce casos portadores de la mutación en el codón 1309.

Las mutaciones en *APC* fueron todas truncantes para la proteína y se distribuían entre los codones 49-1569, con más de la mitad de las mismas localizadas en la primera mitad del exón 15 del gen. En lo que respecta a las mutaciones puntuales, el 25,3% se localizaban en el *Mutation Cluster Region* (MCR), resultado concordante con lo publicado en poblaciones italiana, alemana y noruega (3,6-34%) (De Rosa 2003; Aceto 2005; Friedl 2005; Truta 2005; Plawski 2008; Andresen 2009). Las mutaciones en los puntos calientes, codones 1061 y 1309, se encontraron en un 5,3% y 12,6% de los casos, respectivamente, cifras inferiores al 8% y 20% recogido en otros estudios (Goss 2000; Fearnhead 2001), pero similares a los

porcentajes descritos en otras poblaciones europeas e, incluso, en población española (Heinimann 1998; Giarola 1999; Wallis 1999; Friedl 2001; Aretz 2004; Gomez-Fernandez 2009).

Ocho familias con PAF clásica resultaron ser portadores de mutaciones en localizaciones clásicamente asociadas a formas atenuadas de la enfermedad (PAFA). Se identificaron 4 mutaciones aguas arriba al codón 157, y otras 4 aguas abajo al codón 1516. Este resultado apoya la recomendación de incluir estas áreas en el estudio mutacional convencional del gen *APC* incluso en fenotipos clásicos (Brensinger 1998; Rozen 1999).

Por otra parte seis casos con fenotipo clásico resultaron portadores de mutaciones en *MUTYH*. Aunque las mutaciones en este gen se han sugerido como una de las principales causas de la versión atenuada del síndrome, también habían sido descritas en un pequeño porcentaje de formas clásicas (Lefevre 2009). La distribución y la frecuencia de las mutaciones en *APC* y *MUTYH* en el presente trabajo sugieren que debe considerarse un estudio genético amplio cuando se diagnostique una poliposis clásica en la familia. Este estudio debe incluir los extremos 3' y 5' del gen *APC* y el estudio de *MUTYH* en los casos negativos.

### **1.1 Correlación genotipo-fenotipo.**

Los estudios de correlación entre el genotipo y el fenotipo pueden ayudar a definir el fenotipo que más probablemente se asocie a una determinada mutación. Previamente es necesario recoger correctamente la información clínica de los portadores de mutaciones en *APC*, tratando de documentar con fiabilidad cada rasgo clínico, circunstancia que no ha debido de observarse en algunos de nuestros casos. Este esfuerzo contribuye a establecer programas de seguimiento y tratamientos quirúrgicos profilácticos ajustados al fenotipo más probable asociado a cada mutación. Las mutaciones que afectan al MCR, especialmente al codón 1309, se asocian con una edad de debut de la enfermedad más temprana (Won 1999; Kanter-Smoler 2008), lo que refuerza la noción de que esta localización se asocia a un fenotipo más severo (Caspari 1994; Nieuwenhuis 2007; Plawski 2008). En nuestro estudio, encontramos que la edad media de debut en los casos *APC*-positivos sin antecedentes familiares del síndrome fue de 30 años, similar a lo ya descrito (Won 1999; Ficari 2000; Bertario 2003; Kanter-Smoler 2008). Incluimos sólo aquellos casos sin antecedentes familiares para evitar sesgos relacionados con una detección temprana en casos con historia familiar previa.

Siete familias mostraron alguna “forma profusa”, forma severa de la enfermedad caracterizada por el desarrollo de miles de pólipos antes de la veintena. En una de ellas no se identificó ninguna mutación ni en *APC*, ni en *MUTYH*, mientras que los otros seis pacientes portaban mutaciones localizadas en distintos dominios del gen *APC*. Desde una mutación en el codón 1309, hasta una mutación en el codón 49 previamente asociada a PAFA. Este último hecho no apoya la teoría de que el efecto de una mutación localizada en el extremo 5' del gen puede ser parcialmente compensado por la activación de un segundo comienzo de la traducción en la posición 184, dando lugar a una proteína *APC* parcialmente activa (Heppner Goss 2002). Esta circunstancia de nuevo pone de manifiesto la gran variabilidad en la expresión que exhiben diferentes mutaciones a lo largo de la secuencia de *APC*. En este sentido, hemos identificado dos mutaciones noveles que se asociaban a formas severas (c.145delAAAC y c.3337\_3338delAA, Tabla S3 del material suplementario), hecho que debe tenerse presente de cara al consejo genético de estas familias.

Por otra parte, el patrón de manifestaciones extracolónicas (ME) asociadas a las diferentes mutaciones, mostró algunas diferencias con las series previamente descritas (Figura R3). Sólo la mitad de los casos *APC* o *MUTYH* positivos desarrolló alguna ME. Esta baja proporción probablemente refleja una recogida incompleta de lesiones benignas, circunstancia que no parece ocurrir con las ME más severas.

En la literatura se describe que los tumores desmoides se asocian con mutaciones más allá del codón 1400 aunque también se han descrito asociados a mutaciones en otras áreas del gen (Clark 1999; Bertario 2003; Nieuwenhuis 2007). Por su parte los osteomas aparecen con mayor frecuencia asociados a mutaciones localizadas entre los codones 767 y 1513, y, los quistes epidermoides desde el codon 216 al 1942 (Giardiello 1997; Bisgaard 2006). La hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina (HCEPR), es muy frecuente en aquellas mutaciones entre los codones 311 y 1465 o en mutaciones más allá del exón 9 (Olschwang 1993; Wallis 1994; Tiret 1999). Además, hay algunos estudios que han encontrado relación inversa entre la presencia de tumores desmoides y HCEPR, de modo que cuando la mutación se localiza entre los codones 1445 y 1578, el área de alto riesgo para el desarrollo de tumores desmoides, sería improbable observar también CHPRE (Caspari 1995). Hasta la fecha no se ha encontrado una asociación clara entre la región de *APC* donde se localiza la mutación y el desarrollo de pólipos del tracto digestivo superior. A pesar de ello, su presencia se ha asociado preferentemente a mutaciones en el extremo 3', en el exón 4 y en el área más allá del codón 564 (Nieuwenhuis 2007). Dieciocho de las diecinueve familias que desarrollaron tumores desmoides tenían una mutación localizada entre los codones 232-499 y 805-1465 (Figura R3). Por el contrario tan solo tres desmoides

se asociaron a mutaciones posteriores al codón 1400, área clásicamente relacionada con la presencia de estos tumores (Nieuwenhuis 2007). Aunque los desmoides presentan agregación familiar según algunos estudios (Sturt 2004), tan sólo hubo una familia con varios miembros afectados .

Además observamos una importante proporción de casos con pólipos del tracto superior y/o HCEPR que se asociaban a mutaciones localizadas fuera de las áreas clásicamente relacionadas con su aparición. La falta de una correlación genotipo-fenotipo clara en nuestra población y la variabilidad tanto intra- como interfamiliar que hemos observado, complica la predicción de un fenotipo en función sólo del conocimiento de la mutación y no permite en general ofrecer unas recomendaciones de seguimiento y medidas profilácticas más precisas en función de la mutación detectada en la familia.

## II. ESTUDIO MOLECULAR EN FAMILIAS *APC/MUTYH* NEGATIVAS.

Los pacientes y las familias con una forma clásica de PAF en los que no se identificó ninguna mutación ni en *APC* ni en *MUTYH* mostraron algunas características clínicas diferentes cuando se compararon con los casos con mutación en alguno de los genes. Había una menor presencia de ME (desmoides, HCEPR, osteomas y pólipos del tracto digestivo superior) y una edad de debut del síndrome más tardía (42 vs. 30 años en los casos sin antecedentes familiares). Además, también tenían una mayor incidencia de neoplasias extracolónicas. Este hecho puede reflejar bien la influencia de otros mecanismos de inactivación de los genes *APC/MUTYH* en estas familias, o bien una etiología distinta del síndrome. Aunque la experiencia con este tipo de familias es limitada, estudios previos sugieren que estas familias *APC/MUTYH*-negativas probablemente constituyen un grupo heterogéneo (Renkonen 2005).

Tras los resultados obtenidos en el estudio de la serie completa, decidimos abordar el segundo objetivo de esta tesis: el estudio en profundidad de estas familias en las que no se encontró una mutación en los genes *APC* y *MUTYH*.

### II.1 Ampliación del estudio de *APC*

En primer lugar nos centramos en intentar descartar la total implicación de *APC* ampliando el análisis del gen más allá del estudio convencional. Tal y como se había sugerido en otras publicaciones (Castellsague 2009), comenzamos por estudiar el extremo 3' del gen y ambos promotores. La Familia 341C (Tabla R3), resultó portadora de la mutación c.5790delA;pGln1930HisfsX40, esta mutación se localiza en el área que normalmente se

asocia a PAFA (Half 2009). Tanto el probando, como su madre desarrollaron un fenotipo severo, lo que, de nuevo, viene a confirmar por un lado, la falta de una correlación genotipo fenotipo clara en nuestra población y, por otro, la conveniencia de incluir esta parte del gen en el estudio de rutina.

Respecto al estudio de promotores, hasta la fecha no existen datos concluyentes acerca de variantes patogénicas recogidas en la literatura. El estudio se realizó en las 28 muestras disponibles y se encontraron tres variantes de significado desconocido en el promotor IB. Este promotor no tiene una función definida hasta la fecha aunque se ha descrito su importancia en la regulación de la expresión del gen (Derks 2006; Rohlin 2011). La Familia 0163-99C (Tabla R3), resultó portadora de dos variantes g.[112043282C>G(+)|12072889C>T], que fueron estudiadas y previamente descritas por Castellsagué *et al.* (Castellsague 2009). La variante g.112043263C>T identificada en este estudio (Familia 892C, Tabla R3) parecía interesante tras el estudio bioinformático. Sin embargo, pudimos descartar su patogenicidad ya que apareció en el 2,24% de los controles sanos. Además posteriormente se encontró una mutación en cDNA del probando lo que nos llevó a descartar todas las variantes localizadas en el promotor como causales de la enfermedad.

El estudio de la región 3'-UTR de *APC* no suele incluirse en el estudio convencional del gen, principalmente por la falta de mutaciones en esta localización descritas en la literatura y, también en parte por la ausencia de un conocimiento preciso de la región. Sin embargo, las mutaciones en esta región afectan a la unión de miRNAs reguladores de la expresión del gen lo que constituye un potencial mecanismo de inactivación parcial o total del gen que podría dar lugar al desarrollo de la enfermedad (Nagel 2008; Garzon 2009). Nagel *et al* (Nagel 2008) demostraron funcionalmente que la expresión del gen *APC* está regulada por los miRNA-135 a y b, y sugieren la contribución de la desregulación de este mecanismo en el cáncer colorrectal. Esto apoya la necesidad de incluir este área en el estudio mutacional del gen *APC*, como ya ha sido sugerido por otros autores (Peterlongo 2005; Castellsague 2009).

En nuestro estudio hemos identificado una variante de significado desconocido en esta región. No obstante, dada la imposibilidad de conseguir muestras de otros familiares (Familia 965C, Tabla R3), con el fin de valorar la segregación de la variante, decidimos realizar un estudio en población control sana (n=834). Un individuo control resultó ser portador de la variante, no hay datos del individuo con posterioridad a la toma de muestra y la frecuencia (0,12%) no permite establecer sin lugar a dudas la condición de polimorfismo.

Según los resultados bioinformáticos obtenidos mediante los programas de predicción del perfil de miRNAs que se unen a un 3'UTR dado, la variante daría lugar una nueva secuencia diana para la unión de los miRNAs Hsa-miR-31, Hsa-miR-24-1 y Hsa-miR-24-2. Además de esto, la variante podría producir un cambio en la energía libre de la molécula que condiciona el perfil de miRNAs que se unen. Está demostrada la expresión de este miRNA (Hsa-miR-24-2) en epitelio colorrectal normal (Liang 2007), y en cánceres de colon (Volinia 2006). Además hay evidencias del papel que juega este miRNA en la progresión desde la mucosa normal del colon hasta el adenocarcinoma, tomando parte desde los primeros estadios de esta secuencia (Bartley 2011). Es decir, estos datos apuntan a que la desregulación de Hsa-miR-24-2 podría ser desencadenante de la enfermedad. Para tratar de confirmar la asociación de la variante y la aparición de la enfermedad, tenemos previsto continuar el trabajo iniciado en esta tesis, realizando estudios funcionales que permitan demostrar la desregulación del gen *APC*.

En los últimos años se ha descrito la relación entre desbalances alélicos y desarrollo de la PAF, de CCR o de otros tumores (Yan 2002; Chen 2008; Valle 2008; Castellsague 2009; Palacios 2009). En el caso de la PAF el abordaje de este estudio resultaba interesante de cara a la confirmación de que pequeños desbalances en la expresión del gen pueden predisponer para el desarrollo de la enfermedad. El estudio no fue sencillo en primer lugar, por la limitada disponibilidad de ARN y porque varios pacientes había fallecido antes de que el estudio comenzara. Además, resultó también difícil encontrar el marcador idóneo, un SNP con un alto nivel de heterocigosidad en la población, para discriminar ambos alelos. Tres de nuestros casos mostraron inicialmente un desbalance alélico, pero en dos de ellos no llegó finalmente a confirmarse. Existe una correlación entre la proximidad al exón 15 de la mutación y el grado de desbalance alélico, que hace pensar que la respuesta *nonsense mediated decay* (NMD) en los transcritos truncados de este gen se correlaciona con la localización de la mutación. Esto es, que tan sólo algunos transcritos truncados estarían siendo eliminados por NMD mientras que otros permanecen en la célula dependiendo de la localización de la mutación, por lo que no mostrarían un desbalance alélico. En cuatro pacientes *APC/MUTYH* negativos incluidos en este estudio, el desbalance alélico había sido ya previamente analizado en los laboratorios del ICO y los resultados publicados (Castellsague 2009). Uno de estos casos mostró un desbalance alélico (Familia 0163-99C, Tabla R3), que es el mismo paciente portador de las variantes g.[112043282C>G(+)]112072889 C>T], del promotor 1B del gen. Del resto de los casos estudiados en nuestro laboratorio, uno mostró desbalance alélico (Familia 511C, Tabla R3) y otros dos casos mostraron valores cercanos a los límites en al menos alguna de las réplicas del experimento. La segregación de

la enfermedad con el locus *APC* en la Familia 511C, con desbalance alélico fue confirmada mediante el análisis de microsatélites que flanqueaban dicho locus.

El siguiente paso en el análisis de los tres casos con desbalance alélico, fue descartar la presencia de patrones de metilación aberrante (epimutaciones) a nivel germinal. Nuestro análisis no aportó ningún caso positivo, un resultado similar al encontrado por Romero-Giménez *et al* en una serie de PAF española (Romero-Gimenez 2008).

Dado que en uno de los casos con desbalance había segregación con el locus de *APC*, decidimos plantear el estudio mutacional en el cDNA de *APC*. Este nuevo paso nos permitiría descartar la presencia de mutaciones localizadas en la profundidad de los intrones que dieran lugar a un procesamiento aberrante del mensajero, y, también, posibles falsos negativos.

Se identificaron siete mutaciones, todas en casos con antecedentes de la enfermedad. Seis de estas mutaciones (Tabla R4), están localizadas en los exones o en el principio del intrón y constituyen falsos negativos del estudio convencional inicial. Se deben a la presencia de polimorfismos en los *primers* utilizados para el estudio original que no se conocían cuando se diseñó aquel estudio, o bien a la actualización en la anotación y extensión de los exones del gen. Esto nos lleva a insistir en la importancia de una continua actualización de los datos que se conocen del gen de cara a incrementar la fiabilidad del estudio rutinario.

La séptima mutación encontrada es un caso de especial interés que se detalla en el Apartado 2.2.3. de Resultados de esta tesis. Corresponde a una mutación localizada en el interior de un intrón, en un punto alejado de las secuencias exónicas. Las mutaciones localizadas en la profundidad de un intrón, que dan lugar a un procesamiento aberrante del mensajero mediante la creación de un nuevo sitio críptico, se describieron por primera vez en 1983 para el gen de la  $\beta$ -globina y posteriormente en el año 1994 para el gen responsable de la Fibrosis Quística CFTR (Treisman 1983; Cheng 1984; Highsmith 1994), y han sido descritas con posterioridad en otras entidades (Clendenning 2011; Mancini 2012; Webb 2012). Recientemente se ha publicado un estudio en el que se describen dos mutaciones intrónicas encontradas en 10 familias alemanas con PAF (Spier 2012). En nuestro caso es la primera mutación localizada en un intrón que se describe en población española. Es además la primera vez que se describe una mutación que localizándose tan lejos del extremo 5' del exón, provoca un procesamiento aberrante. Hemos confirmado la presencia del transcrito aberrante y la segregación en la familia junto a un fenotipo atenuado de la enfermedad. Que esta mutación se correlacione con un fenotipo atenuado, concuerda con la hipótesis de que

mutaciones localizadas en el extremos 5' del gen y en los intrones 4 y 9, provocan la presencia de este tipo de fenotipos (Heppner Goss 2002; Nieuwenhuis 2007; Half 2009) .

En este caso además el patrón de expresión IHQ de las proteínas Apc y  $\beta$ -catenina mostró un acumulo de ambas y una localización nuclear de la  $\beta$ -catenina, lo que concuerda con el perfil de expresión de estas dos proteínas en la mayoría de los pólipos APC positivos incluidos en el TMA, como se ha visto en el correspondiente apartado de los Resultados.

Tras concluir todos los estudios en el gen APC comentados, nos planteamos que los mosaicismos implicando del gen podían ser responsables de la enfermedad en algunos de nuestros casos APC negativos. Los mosaicismos de APC se han descrito como la causa de la PAF en un 4% de los casos estudiados y hasta un 11-20 % de las mutaciones *de novo* encontradas (Hes 2008; Mongin 2011; Necker 2011) . El estudio de mosaicismos es difícil y no está exento de limitaciones, aunque varios autores abogan por un tipo de abordaje que en algunos casos permitiría descartar la presencia del mosaicismo (Necker 2011). La técnica idónea sería el test de la proteína truncada (PTT), que hemos utilizado en este estudio para analizar el exón 15 del gen APC. Se encontraron tres perfiles de bandeo aberrantes en la región del MCR como se observa en la Figura R6. Los tres individuos eran casos únicos en la familia lo que apoya la hipótesis de mosaicismo (Necker 2011). Para su validación se repitió el estudio mutacional en ADN genómico obtenido de linfocitos del paciente y de tejido colorrectal. Los resultados demostraron la presencia de una mutación c. 4393\_4394delAG;pS1465Wfs3 en la Familia 0373-00C (Tabla R3) que apenas podía intuirse en ADN procedente de linfocitos. Afortunadamente disponíamos de tejido tumoral, pero no de colon normal, donde se confirmó la presencia de un LOH del alelo mutado. En la familia 126C (Tabla R3), no se detectó ningún resto de mutación en ADN germinal, pero en tejido tumoral se encontró la misma mutación que en el caso anterior c. 4393\_4394delAG;pS1465Wfs3. En los pólipos de este paciente pudimos ver una mayor amplificación del alelo mutado y por lo tanto una selección clonal de la población celular con la mutación. Además la mutación se confirmó en tejido normal adyacente a tumor. En el último caso detectamos una variante silente en el tejido tumoral que podría afectar al procesamiento del mRNA, este tipo de mutaciones ya ha sido descrita con anterioridad en APC (Montera 2001; Aretz 2004) , para una total confirmación necesitamos realizar análisis más detallados en la variante por lo que el estudio sigue abierto.



## II.2 Estudio del gen *MUTYH*

Las mutaciones Y165C y G382D en el gen *MUTYH* tienen un carácter recurrente en población caucásica y representan el 82% de todas las mutaciones encontradas (Sampson 2005; Win 2010). En otras poblaciones esta proporción varía (Gismondi 2004; Isidro 2004; Dolwani 2007; Chen 2008; Win 2010). A pesar de que todos nuestros casos resultaron negativos para estas dos mutaciones, decidimos estudiar el gen completo de cara a descartar su implicación en nuestras familias. No se encontraron mutaciones en otras regiones del gen. La reciente publicación de un caso portador de un gran reordenamiento del gen *MUTYH* en homocigosis (Rouleau 2011) nos llevó a plantearnos el estudio en nuestros casos, pero tal y como se describe en el apartado 3.1 de Resultados todos resultaron negativos. Estos resultados confirman el papel limitado del gen *MUTYH* las formas clásicas de la PAF.

## III. PAPEL DE OTROS GENES DE LA VÍA WNT EN LAS FAMILIAS *APC/MUTYH* NEGATIVAS.

Tras descartar la implicación de *APC* y *MUTYH* en nuestras familias, nos dispusimos a abordar el tercer objetivo que era analizar la implicación de otros genes en el síndrome. Nuestros principales candidatos fueron los genes *AXIN2* y *GSK3 $\beta$* , ambos genes implicados en la vía Wnt y que forman junto con *APC* del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina.

### III.1 Estudio del gen *AXIN2*

*AXIN2* es el factor limitante de aquel complejo y está sujeto a una estricta regulación por parte de varias proteínas que forman parte la ruta. Entre ellas se sabe que existe un bucle de retroalimentación positiva y la propia  $\beta$ -catenina regula la síntesis de *AXIN2* (Huang 2009).

Se conoce poco del papel real de *AXIN2* en el cáncer colorrectal (CCR) pero existen tres casos descritos en los que se identificaron alteraciones en este gen en pacientes con neoplasias gastrointestinales y signos de displasia ectodérmica (Lammi 2004; Marvin 2011).

En nuestro estudio la Familia 677C (Tabla R3), resultó portadora de la variante c.1387C>T; p.R463C. Tras los primeros estudios de predicción con ayuda del programa *Polyphen2*, que consideraba probable un efecto patogénico, decidimos profundizar en el estudio de la variante y de la familia. Nuestros resultados confirmaron que la variante no estaba presente en las bases de datos públicas [www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php) ; [www.evs.gs.washington.edu/EVS/](http://www.evs.gs.washington.edu/EVS/); [www.1000genomes.org/](http://www.1000genomes.org/) , ni en una población control española, lo que seguía apoyando un posible efecto patogénico y su relación con el

desarrollo de la PAFA en la familia. Los estudios llevados a cabo en tejido tumoral (confirmación de la LOH, los análisis inmunohistoquímicos y la falta de co-localización de Axin2 y  $\beta$ -catenina observada mediante la tinción con inmunofluorescencia), nos revelaron la probable alteración de la función de Axin2. Decidimos estudiar a los miembros de la familia y confirmar así la segregación de la variante.

Aunque el conocimiento del fenotipo asociado a una alteración germinal de *AXIN2* es hoy por hoy, limitado, los casos descritos refieren una gran variabilidad tanto en la edad de debut de la enfermedad como en el número y tipo de los pólipos desarrollados. Lammi *et al* (Lammi 2004) describieron una familia con 9 portadores de una mutación que truncaba la proteína. El fenotipo intestinal varía desde el desarrollo de 68 adenomas a las edad de 57 años, ningún adenoma con 26 años e incluso un portador que tan sólo desarrolló un adenoma a los 58 años de edad. La variabilidad clínica es incluso mayor en el estudio publicado por Marvin *et al.* (Marvin 2011) , desde más de 100 pólipos a los 65 años hasta ninguno a los 35. Además, en este trabajo los afectados muestran tanto adenomas, como pólipos hiperplásicos, con una localización también variable y acompañados de otras neoplasias, diferentes al CCR, entre los portadores. Con estos antecedentes, la ausencia de pólipos en la hermana del probando a los 43 años (Figura R19) podría considerarse un hecho explicable por esta alta variabilidad clínica.

Cabe señalar por otra parte, la falta de signos de displasia ectodérmica u otra ME entre los portadores. La gran mayoría de mutaciones del gen *AXIN2* han sido identificadas en familias con oligodontia. Además, otras manifestaciones como hendiduras palatinas y diferentes tipos de cáncer (melanoma y CCR entre otros), han sido recientemente relacionadas con mutaciones en *AXIN2* (Menezes 2009; Pedace 2011).

Sin embargo, hasta la fecha, tan sólo unos pocos trabajos han estudiado *AXIN2* en pacientes con CCR y/o poliposis. Ya se ha comentado que la mayoría de las alteraciones en el gen se han identificado en pacientes con oligodontia y parece haber cierto sesgo para la selección de pacientes con este defecto para el estudio de *AXIN2* (Lammi 2004; Marvin 2011; Mongin 2011).

Leujene *et al.*(Lejeune 2006), estudiaron 39 pacientes con PAF o PAFA uno de los cuales estaba diagnosticado de oligodontia severa. Encontraron tan solo un par de variantes no patogénicas en *AXIN2*. Por su parte Peterlongo *et al.* (Peterlongo 2005), describió algunas variantes en el gen en un estudio de 82 pacientes con CCR hereditario en los que se descartaron mutaciones en los genes *DNA mismatch repair* (MMR) y ninguna de las variantes en *AXIN2* fue considerada como patogénica. En el único estudio publicado hasta la fecha en

casos *APC/MUTYH* negativos, Renkonen et al. (Renkonen 2005), describieron la familia portadora de una mutación en *AXIN2* anteriormente descrita en el trabajo mencionado de Lammi et al. (Lammi 2004). En el estudio de Mogin et al. (Mogin 2011), se incluyeron 38 pacientes con adenomas o pólipos serrados y, en todos los casos, el análisis de *AXIN2* resultó negativo. Teniendo todo lo anterior en cuenta, es probable que el número de pacientes con poliposis a los que se les ha estudiado el gen *AXIN2* sea aún insuficiente y no resulte sencillo definir el papel real de este gen en la poliposis familiar.

Así mismo con el limitado número de mutaciones en *AXIN2* descritas hasta el momento, es difícil establecer una relación clara entre el genotipo y el fenotipo asociado. No obstante, todas las mutaciones descritas hasta la fecha asociadas con oligodontia, se localizan en el exón 7 del gen, aguas abajo del nucleótido 1900. La variante descrita en nuestro estudio se localiza en el codón 463 en el exón 5, lejos de sitio de localización de las mutaciones asociadas a oligodontia. Tal y como se ha descrito para otros genes, entre ellos *APC*, diferentes fenotipos son esperables dependiendo del dominio proteico afectado por la mutación. Algo similar podría suceder con esta familia, aunque para aclarar este extremo serían necesarios estudios funcionales. El papel definitivo del gen *AXIN2* en la poliposis adenomatosa requiere de estudios en nuevas series de familias con PAF y PAFA y estudio negativo de los genes *APC* y *MUTYH*.

### III.2 Estudio del gen *GSK3 $\beta$*

El segundo gen candidato dentro de la ruta Wnt fue la quinasa *GSK3 $\beta$* . El papel de esta proteína en cáncer no está claro, aunque está ligado a la estricta regulación de la degradación de la  $\beta$ -catenina. Esta quinasa está involucrada en procesos tan diversos como desarrollo, muerte celular, metabolismo del crecimiento, diabetes, y varias enfermedades neurodegenerativas (Jacobs 2012). *GSK3 $\beta$*  parece estar implicado en el desarrollo de la polaridad neuronal, del eje corporal, en cardiomiopatías hipertróficas y en enfermedades neurológicas como el Parkinson, Alzheimer y algunos trastornos bipolares (Kwok 2005; Liu 2007; Beaulieu 2008; Kerkela 2008; Hur 2010) pero no se conocen alteraciones del gen asociadas con formas familiares de CCR. Tampoco tenemos evidencias de que se haya valorado su papel en series de pacientes con PAF o PAFA u otras formas de susceptibilidad genética al cáncer.

En el presente estudio identificamos una variante en el exón 10 en un paciente con antecedentes familiares de la enfermedad. Las predicciones de los distintos programas bioinformáticos nos llevaron a pensar que la variante puede ser la responsable de la

enfermedad en la familia. Estudiamos una población de 820 controles en los que no se encontró la variante. Tampoco se describe en la base de datos *1000 genomes*. Tan sólo en 1 de 4518 alelos analizados en el *Exome Sequencing Project* (ESP) se describe esta variante sin que se tengan más datos. No obstante la información de la base de datos ESP está sacada de población norteamericana, y la procedencia de los casos incluidos no es conocida, así como la categoría caso o control de los mismos.

Desafortunadamente no dispusimos de tejido tumoral para estudiar la posible pérdida de heterozigosis en el paciente. La madre y la abuela materna del probando estaban afectadas y fallecieron debido a la enfermedad, por lo que no fue posible estudiar la segregación en la familia. Dados estos resultados es difícil establecer la relación entre esta variante y la enfermedad en la familia.

#### IV. PAPEL DEL GEN *BUB1B* EN LAS FAMILIAS *APC/MUTYH* NEGATIVAS.

Además de la evaluación de algunos genes de la ruta Wnt, también decidimos valorar en nuestras familias el gen *BUB1B*, receptor del gen *BUB1* ambos con una papel esencial en la vía SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) en ciclo celular. Este paso en nuestro estudio fue determinado por la reciente publicación de un trabajo realizado por Rio Frío *et al.* (Rio Frío 2010) en el que se describía un paciente con múltiples neoplasias intestinales portador de una mutación homocigota en el gen *BUB1B*. Un mes más tarde se publicó otro caso de neoplasias gástricas asociada a una mutación en el gen *BUB* (de Voer 2011).

Las mutaciones en estos genes estaban asociadas al desarrollo de aneuploidías variegadas en mosaico (Hanks 2004; Matsuura 2006), y por lo tanto, el primer estudio realizado en nuestros pacientes fue el cariotipo. Obtuvimos muestra de cinco (Familias 66C, 678C, 965C, 892C y 1015C, Tabla R3) y tan sólo se encontró una anomalía, aneuploidía de cromosomas sexuales en el 25% de las metafases analizadas (Familia 965C, Tabla R3). Repetimos el estudio citogenético pero no logramos ratificar aquel resultado, que finalmente interpretamos como un artefacto del primer cultivo. Dado que la presencia de alteraciones cromosómicas sería la primera clave en portadores de mutaciones en este gen no consideramos apropiado continuar con el estudio mutacional. Sí se analizó la expresión de la proteína Bub1 en todas las muestras incluidas en el TMA, no se encontraron diferencias en el patrón de expresión en comparación a los pólipos *APC* positivos por lo que a pesar de que en algunos casos negativos vimos una falta de expresión de Bub1 consideramos poco probable la presencia de alteraciones en estos genes como responsables del fenotipo de nuestras familias.

## V. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO (IHQ) DE LOS PÓLIPOS ADENOMATOSOS

### V.1 ¿Los pólipos de los pacientes negativos muestran un perfil de expresión IHQ característico?

En el análisis no supervisado de los perfiles de expresión IHQ de los distintos grupos de pólipos, encontramos que el perfil de los pólipos negativos resultaba indistinguible del de los otros grupos de pólipos: *APC* y *MUTYH* positivos, oligopoliposis o esporádicos. Con respecto al nivel de expresión de Apc identificamos una alta expresión de la proteína Apc en pacientes portadores de mutación en *APC* probablemente debida a un efecto dominante negativo de las mutaciones. Del mismo modo, este aumento de sobreexpresión se detectó en los pólipos negativos, los pólipos *MUTYH* positivos, los esporádicos y las poliposis mixta. Dado el gen *APC* aparece mutado somáticamente en el 70-80% de los adenomas y carcinomas colorrectales esporádicos (Fearon 2010) la implicación somática del gen da lugar a un patrón de aberrante expresión de la proteína Apc independientemente de la base genética del pólipo. Y es que, en la secuencia adenoma carcinoma, las alteraciones somáticas del gen tienen lugar en los primeros estadios de la transición, detectándose hasta en adenomas microscópicos compuestos por tan solo algunas glándulas (Kinzler 1996; Polakis 2007; Fearon 2010). Cabe destacar que en el caso de las oligopoliposis la expresión de la proteína Apc mostraban patrones basales similares a los encontrados en los epitelios normales, este hecho podría indicar una etiología diferente del síndrome en estas formas de poliposis.

En el análisis supervisado tampoco obtuvimos resultados llamativos que diferenciaron claramente a los pólipos de pacientes con estudio genético negativo. Obtuvimos algún resultado significativo que no resulta fácil de explicar, por ejemplo al comparar los pólipos negativos con los *MUTYH* positivos, Cdk2 aparece sobreexpresado en los últimos, pudiendo indicar una mayor capacidad proliferativa de estos pólipos. En la comparación de los pólipos negativos con los esporádicos tan sólo una tendencia a la subexpresión de Bcl2 en los pólipos negativos fue detectada. Con respecto a las formas oligopolipósicas encontramos diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de Apc confirmando así que las formas oligopolipósicas presentan niveles de expresión normales de Apc con respecto a los pólipos negativos en este caso. Los marcadores Ciclina E, Rb y Cox2 también mostraron cierta tendencia en sus patrones de expresión al comparar los pólipos negativos con las formas oligopolipósicas. Estos datos pueden apoyar la teoría de una diferencia etiológica de las formas oligopolipósicas, pero más estudios con representaciones muestrales mucho más amplias son necesarios para interpretar estos resultados.

## **V.2 Perfil IHQ de la progresión desde un epitelio normal hasta un adenocarcinoma en cuatro fases (Normal-Adenoma-Adenoma Alto grado de diferenciación-Carcinoma)**

Aunque el análisis del TMA no sirvió para identificar diferencias entre los distintos tipos de pólipos y los pólipos *APC/MUTYH* negativos, sí que se detectaron diferencias en algunas agrupaciones surgidas en el análisis supervisado y no supervisado. Estas diferencias son un claro reflejo de los distintos grados del tumor y de las distintas fases en la secuencia adenoma-carcinoma, de las muestras incluidas en el TMA.

La secuencia de cambios moleculares que sufre una mucosa normal del colon hasta convertirse en un adenocarcinoma fue descrita por primera vez por Fearon y Volgestein en 1990 (Vogelstein 1988; Fearon 1990). Alteraciones en distintos genes son responsables del paso de epitelio normal a adenoma temprano, y otros intervienen en la transición de adenoma tardío hasta el carcinoma.

En nuestro TMA dispusimos de representación de los cuatro estadios mencionados y, el resultado del agrupamiento no supervisado reveló perfiles de expresión diferentes para cada uno de ellos. Estos perfiles se vieron reforzados por los resultados del análisis supervisado de los cuatro grupos de muestras comparados según el nivel de progresión.

La gran mayoría de los cambios significativos se encontró en el paso de un epitelio normal a un pólipo adenomatoso con displasia epitelial de bajo grado o adenoma temprano (Bartley 2011). Se debe tener en cuenta que los cambios en la expresión IHQ de una proteína puede deberse no solo a la adquisición de mutaciones somáticas en el gen, sino también a una desregulación de la vía metabólica en la que esté involucrada. El paso de la mucosa normal a adenoma temprano viene determinado en primer lugar por la expresión de *APC*. *APC* puede considerarse un “goalkeeper” tal y como Kinzler y Volgestein argumentaban (Kinzler 1996), cuya desregulación constituye un evento inicial presente incluso en microadenomas y en el 80% de los adenomas y CCR, aproximadamente (Kinzler 1996; Segditsas 2006; Polakis 2007). Es lógico pensar que, como consecuencia de la continua activación de la vía Wnt en el pólipo adenomatoso, aparecen sobreexpresados marcadores como *Gsk3b*, y debido a la continua activación del ciclo celular marcadores como *Ciclina D1*, *Ciclina E* y *Cdk2*. Por otra parte, el aumento en la expresión de *Bcl2* supondría una respuesta de bloqueo de la apoptosis, mientras que, el aumento de *hTERT*, puede resultar de la erosión telomérica que sufre una célula en continua división.

En lo que se refiere al segundo estadio en la transición (de adenoma temprano a adenoma tardío), se observa una pérdida de expresión de la quinasa *GSK3β* y la telomerasa *Htert*,

confirmando así que la sobreexpresión de estas proteínas es característico de adenomas tempranos. El adenoma tardío también viene caracterizado por la disminución de la expresión de p21 (supresor del complejo cdk2-ciclina que ayuda al proceso proliferativo del pólipo adenomatoso con displasia epitelial de alto grado de diferenciación), y la pérdida de expresión de las proteínas reparadora de errores de emparejamiento, principalmente Msh6.

Además del aumento en la acumulación de  $\beta$ -catenina con localización nuclear propia de la continua activación de la vía Wnt, dos eventos claros marcan el paso a adenocarcinoma: la baja expresión de Smad4, probablemente como consecuencia de la pérdida de heterozigosidad o LOH del brazo largo del cromosoma 18 observada en el 70% de los cánceres colorrectales (Vogelstein 1988; Fearon 1990), unido a la presencia de mutaciones somáticas Smad4 descrita en el 15% de los CCR (Wood 2007; Leary 2008). Y, en segundo lugar, la expresión baja de Klf4 en concordancia con otros estudios tanto en adenomas de ratón como en pacientes portadores de mutaciones en APC (Dang 2000; Ghaleb 2007). Dado el papel de Klf4 en la regulación del ciclo celular y en la diferenciación de las células epiteliales del intestino (Shields 1996), esta pérdida de expresión en el estadio de adenocarcinoma podría sugerir una importante función del gen en la progresión de los adenomas colorrectales (Choi 2006).

---





ONCLUSIONES



1) El estudio inicial del gen *APC* en las formas clásicas de Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) debe ser amplio, incluyendo aquellas áreas clásicamente asociadas a formas atenuadas de la enfermedad- antes del codón 157 y más allá del 1516-. En nuestra serie han aparecido 9 casos (6,6%) con fenotipo clásico asociado a mutaciones en esas regiones .

En los casos con resultado negativo en *APC* debe valorarse el estudio del gen *MUTYH*, comenzando por las mutaciones recurrentes y dependiendo de las características clínicas y familiares del paciente, valorar el estudio completo del gen. Seis de nuestros 136 casos (4,4%) fueron explicados por mutaciones en *MUTYH*.

2) La falta de una correlación genotipo-fenotipo clara en nuestra población y la variabilidad tanto intra- como interfamiliar observada, complica la predicción de un fenotipo en función sólo del conocimiento de la mutación. Estos resultados deberían ser tenidos en cuenta de cara a las recomendaciones de seguimiento y medidas profilácticas para pacientes diagnosticados de PAF en población española.

3) En aquellos casos con resultado negativo en el estudio de *APC* y de *MUTYH* cabe plantear otras técnicas para descartar la implicación *APC*. En el 36% de los casos negativos de nuestra serie encontramos una alteración patogénica en *APC*, no identificada en el estudio inicial del gen. El estudio de cDNA y el análisis de posibles mosaicismos serían los primeros pasos en orden de rendimiento.

4) El estudio de otros genes, como *AXIN2* e, incluso, *GSK3B* , estarían indicados en familias seleccionadas: *APC/MUTYH* negativas con una alta carga genética y/o con características clínicas sugestivas tales como la displasia ectodérmica o pólipos hiperplásicos.

5) Existe un 50% de los casos *APC/MUTYH* negativos en los que no se detecta el mecanismo causal del síndrome. Por lo tanto, existe la posibilidad de que otros genes puedan estar implicados en la enfermedad y serían necesarios otros estudios destinados a identificar mutaciones en genes no relacionados con la enfermedad hasta el momento

6) El patrón de expresión IHQ de los pólipos de pacientes negativos no muestra características especiales que lo diferencien de aquellos pólipos con mutaciones en *APC* o *MUTYH*, o con las formas oligopolipósicas o los pólipos esporádicos. Los pólipos negativos muestran diferencias significativas en el patrón de expresión del marcador *Cdk2* con respecto a los pólipos que portan mutaciones germinales en *MUTYH*. *Una tendencia diferente se encontró en la expresión de los marcadores Bcl2, Ciclina E, Rb y Cox2 al comparar estos pólipos negativos con las formas esporádicas y oligopolipósicas. Estos resultados son de difícil interpretación a la hora conclusiones a cerca de la etiología de la enfermedad.*

7) En concreto el patrón de expresión de la proteína *Apc* es similar en los diferentes tipos de pólipos independientemente de su base genética, por lo que esta técnica no reporta información concluyente a la hora de interpretar la etiología de las diferentes formas de poliposis adenomatosa. Las formas oligopolipósicas podrían representar una excepción ya que muestran un patrón de expresión de *Apc* basal y diferente al resto de los tipos de pólipos que podría indicar una etiología diferente del síndrome en estos casos.

8) Los perfiles de expresión IHQ en mucosa colorrectal normal, adenomas de bajo grado de diferenciación, adenomas de alto grado de diferenciación y carcinomas, representan fielmente los cambios genéticos observados en cada una de las fases de la transición adenoma-carcinoma, independientemente de la carga genética del paciente.



---



**NEXO 1:**

**MATERIAL SUPLEMENTARIO  
TEST ESTADÍSTICOS  
CUESTIONARIO Y CONSENTIMIENTOS  
ÁRBOLES FAMILIARES  
PÁGINAS WEB**





Longitud (nucleótidos)	Sonda MLPA	Posición cromosómica		
		Control	APC	MUTYH
64-70-76-82	Sonda control Q-Calidad de ADN			
89-92-96	Sonda control D-Control de desnaturalización			
100	Sonda control Cromosoma X			
105	Sonda control Cromosoma Y			
130	Sonda control 00797-L00463	5q31.1		
136	Sonda <b>MUTYH 15776-L17833</b>			exón 9
142	Sonda <b>APC 01532-L01743</b>		exón 2	
150	Sonda <b>APC 11988-L14165</b>		exón 2	
157	Sonda control 01063-L00061	14q13		
171	Sonda <b>APC 01534-L19320</b>		exón 3	
178	Sonda <b>APC 01535-L19321</b>		exón 4	
186	Sonda control 01217-L19322	4q35		
193	Sonda <b>APC 01536-L00979</b>		exón 5	
202	Sonda <b>APC 01537-L00980</b>		exón 6	
211	Sonda control 08308-L05164			
220	Sonda <b>APC 01538-L00981</b>		exón 7	
229	Sonda <b>APC 01539-L01337</b>		exón 8	
238	Sonda control 00517-L00097	2q13		
246	Sonda <b>APC 01540-L0983</b>		exón 9	
253	Sonda <b>MUTYH 02110-L04024</b>			exón 1
267	Sonda <b>APC 01541-L19325</b>		exón 10	
274	Sonda <b>APC 15276-L19326</b>		exón 1	
282	Sonda <b>APC 01542-L19327</b>		exón 11	
292	Sonda <b>APC 11990-L19328</b>		exón 12	
297	Sonda control 04355-L19329	7q21		
306	Sonda <b>APC 01544-L00987</b>		exón 13	
312	Sonda <b>APC 01545-L01338</b>		exón 14	
321	Sonda control 15301-L19330	9q34		
328	Sonda <b>APC 01774-L01340</b>		exón 15	
337	Sonda <b>APC 01700-L01341</b>		exón 16	
346	Sonda <b>MUTYH 14912-L19331</b>			
356	Sonda <b>APC 15636-L00992</b>		exón 18	exón 4
365	Sonda <b>APC 01548-L20445</b>		exón 17	
373	Sonda control 12234-L13162	12p13		
382	Sonda <b>APC 01550-L00993</b>			
391	Sonda <b>APC 12035-L12895</b>		exón 18	
400	Sonda control 08871-L08927	1p31	exón 15	
409	Sonda <b>APC 03323-L02526</b>	Intrón 13		
418	Sonda <b>APC 03324-L02527</b>		exón 18	
427	Sonda <b>APC 03325-L02528</b>		exón 18	
445	Sonda control 11533-L12275	19q13		

**Tabla S1.** Sondas utilizadas en el producto comercial de MLPA, *SALSA P043-C1* *APC*, para la detección de grandes reordenamientos de los genes *APC* y *MUTYH*. Se indica la longitud de cada sonda y el exón del gen en el que se localiza, así como las sondas control y su localización cromosómica.

Longitud (nucleótidos)	Sonda MLPA	Posición cromosómica	
		Control	<i>MUTYH</i>
64-70-76-82	Sonda control Q-Calidad de ADN		
89-92-96	Sonda control D-Control de desnaturalización		
100	Sonda control Cromosoma X		
105	Sonda control Cromosoma Y		
130	Sonda control 10775-L11379	15q26	
136	Sonda <i>MUTYH</i> 15776-L17833		exón 9
142	Sonda <i>MUTYH</i> 15777-L17834		exón 5d
148	Sonda <i>MUTYH</i> 15778-L17835		exón 18
154	Sonda control 08939-L09034	11p15	
160	Sonda <i>MUTYH</i> 15779-L17836		exón 15
166	Sonda <i>MUTYH</i> 15780-L17837		exón 8
172	Sonda <i>MUTYH</i> 15781-L17838		exón 6
178	Sonda control 09480-L09737	7q22	
184	Sonda <i>MUTYH</i> 15782-L17839		
190	Sonda <i>MUTYH</i> 15783-L18347		
197	Sonda <i>MUTYH</i> 15784-L17841		
202	Sonda control 11142-L11826		
208	Sonda <i>MUTYH</i> 15785-L17842		exón 10
213	Sonda control 09066-L09235	19p13	
226	Sonda control 13616-L15067	4q35	exón 1
232	Sonda <i>MUTYH</i> 15788-L15067		exón 7
238	Sonda <i>MUTYH</i> 15789-L17845		exón 2
244	Sonda <i>MUTYH</i> 15787-L18348		exón 17
251	Sonda <i>MUTYH</i> 15790-L18349		exón 12
258	Sonda <i>MUTYH</i> 15786-L18350		exón 3
265	Sonda control 08529-L10329	9p24	
274	Sonda <i>MUTYH</i> 15791-L17848		exón 1
283	Sonda <i>MUTYH</i> 15792-L17849		exón 4
292	Sonda <i>MUTYH</i> 15793-L17850		exón 14
301	Sonda control 08601-L08604	17p11	

**Tabla S2.** Sondas utilizadas en el producto comercial de MLPA, SALSA P378-A2 *MUTYH*, para la detección de grandes reordenamientos del gen *MUTYH*. Se indica la longitud de cada sonda y el exón del gen en el que se localiza, así como las sondas control y su localización cromosómica.

## CASOS FAMILIARES: MUTACIONES EN APC

ID Familia	Exón	Mutación	Proteína	Fenotipo
1	2	c.145_148delAAAC	p.Lys49fsX	PP
2	2	c.147_150delACAA	p.Lys49fsX	?
3	3IN	c.423-2A>G		?
4	3IN	c.423-2A>G		?
5	6	c.646C>T	p.Arg216X	?
6	6	c.694C>T	p.Arg232X	TD; PGS
7	6	c.707delA	p.Gln236fs	O
8	7IN	c.834+1G>A		TD; CPT
9	8	c.838delT	p.Ser280fs	TD; PGS
10	8	c.847C>T	p.Arg283X	?
11	8	c.904C>T	p.Arg302X	?
12	8	c.904C>T	p.Arg302X	?
13	8	c.904C>T	p.Arg302X	TD
14	9	c.994C>T	p.Arg332X	?
15	9	c.1262G>A;c.1263G>A	p.Trp421X	PGS
16	9	c.1290-1291ins7	p.Met431fs	?
17	11	c.1495C>T	p.Arg499X	TD
18	12	c.1622dupA	p.Gln542fs	L
19	13	c.1660C>T	p.Arg554X	O
20	13	c.1674_1680del7	p.N558fs	?
21	14	c.1744-2_1754del13	Impredecible	O
22	14	c.1875_1878delGACA	p.Asn627fs	QS
23	14	c.1908dupG	p.Ile638fs	PGS
24	14	c.1927_1936del10	p.Ser643X	HCEPR; O
25	15	c.2327_2328delTA	p.Ile776fs	QS
26	15	c.2327_2328delTA	p. Ile776fs	PGS
27	15	c.2397T>A	p.Tyr799X	?
28	15	c.2413C>T	p.Arg805X	PP; TD; O; L
29	15	c.2727delC	p.Thr910fs	HCEPR; PGS
30	15	c.2805C>A	p.Tyr935X	?
31	15	c.2805C>A	p.Tyr935X	TD
32	15	c.3183_3187delACAAA	p.Gln1062fs*	?
33	15	c.3183_3187delACAAA	p. Gln1062fs*	?
34	15	c.3183_3187delACAAA	p. Gln1062fs*	HCEPR; TD
35	15	c.3183_3187delACAAA	p. Gln1062fs*	PGS; CD
36	15	c.3202_3205delTCAA	p.Ser1068fs	HCEPR; O; AS; PGS
37	15	c.3202_3205delTCAA	p. Ser1068fs	?
38	15	c.3202_3205delTCAA	p. Ser1068fs	?
39	15	c.3311C>A	p.Ser1104X	?
40	15	c.3337_3338delAA	p.Asn1113fs	PP;PGS; L
41	15	c.3340C>T	p.Arg1114X	H
42	15	c.3391C>T	p.Gln1131X	?
43	15	c.3505_3509delGAGAA	p.Glu1169fs	?
44	15	c.3562_3565delCCTT	p.Pro1188fs	?
45	15	c.3562_3565delCCTT	p.Pro1188fs	?
46	15	c.3563delC	p.Pro1188fs	PGS; O
47	15	c.3562_3565delCCTT	p.Pro1188fs	PGS; O; HCEPR
48	15	c.3880C>T	p.Gln1294X	TD
49	15	c.3880C>T	p.Gln1294X	H
50	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	?
51	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	PGS
52	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	PGS; TD;
53	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	?
54	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	PP
55	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	O; PGS;
56	15	c.4025dupT	p.Leu1342fs	?
57	15	c.4128T>A	p.Tyr1376X	HCEPR
58	15	c.4394_4395delAG	p.Ser1465fs	AD

59	15	c.4394_4395delAG	p.Ser1465fs	TD; L; O
ID Familia	Exón	Mutación	Proteína	Fenotipo
60	15	c.4394_4395delAG	p.Ser1465fsX	PGS; TD;
61	15	c.4468dupT	p.His1490fs	?
<b>CASOS FAMILIARES: GRANDES REORDENAMIENTOS EN APC</b>				
62		Deleción Ex8-15		TD
63		Deleción Ex8-15		?
64		Deleción del gen completo		TD
65		Deleción Ex9-10		PGS; TD; O
<b>CASOS FAMILIARES: MUTACIONES BIALÉLICAS EN MUTYH.</b>				
66	13+14	c.1145G>A+c.1185_1186dupGG	p.G382D+p.E438GfsX438	QS; Q
67	13+13	c.1145G>A+c.1145G>A	p.G382D+G382D	?
<b>CASOS FAMILIARES: APC/MUTYH NEGATIVOS</b>				
68	—	—	—	?
69	—	—	—	?
70	—	—	—	PP
71	—	—	—	CPT
72	—	—	—	H
73	—	—	—	CG
74	—	—	—	?
75	—	—	—	?
76	—	—	—	?
77	—	—	—	?
78	—	—	—	TD; HCEPR
79	—	—	—	?
80	—	—	—	PGS
81	—	—	—	O, QS; AS; PGS

**Tabla S3.** Mutaciones y fenotipos en las familias con FAP clásica.

La nomenclatura de proteína se obtuvo del programa Alamut. IN: Intrón.

En la columna de fenotipo se incluyen datos de número de pólipos (formas profusas), y de manifestaciones extracolónicas: ?:desconocido; HCEPR: Hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina; AD: Alteraciones dentales; CD: Carcinoma duodenal; TD: Tumor desmoides; CG: Carcinoma gástrico ; H: Hepatoblastoma; Q: Queratoacantomas; L: Lipoma; O: Osteoma; PP: Forma profusa o fenotipo severo con desarrollo de más 1000 pólipos; CPT: Carcinoma papilar de tiroides; AS: Adenoma suprarrenal ; QS: Quiste sebáceo; PGS:Pólipos del tracto gastrointestinal superior .

\*Mutación recurrente clásica también nombrada como p.K1061Kfs2

## CASOS NO FAMILIARES: MUTACIONES EN APC

ID Familia	Exón	Mutación	Proteína	Fenotipo
82	3	c.281_282insC	p.Ser95fs	?
83	3	c.419_422delAGAG	p.Glu140fs	PGS;
84	4IN	c.531+2T>C		?
85	5	c.637C>T	p.Arg213X	?
86	5	c.643delC	p.Gln215fs	?
87	6	c.646C>T	p.Arg216X	PF
88	6	c.646C>T	p.Arg216X	HCEPR
89	6	c.694C>T	p.Arg232X	?
90	8	c.847C>T	p.Arg283X	?
91	9	c.1262G>A	p.Trp421X	TD
92	11	c.1411_1412insGGGA	p.Leu472fs	?
93	14IN	c.1958+3A>G		PGS
94	15	c.2434_2437delGACA	p.Asp812fs	PGS
95	15	c.2481_2483delinsCACCA	p.Thr829fs	PGS
96	15	c.2807dupA	p.Tyr935X	?
97	15	c.3138_3141delTGAA	p.Asn1046fs	?
98	15	c.3183_3187delACAAA	p.Gln1062fs*	?
99	15	c.3225_3226insA	p.Pro1076X	PF
100	15	c.3367C>T	p.Gln1123X	?
101	15	c.3454C>T,	p.Gln1152X	?
102	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	HCEPR, PGS
103	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	PGS
104	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	?
105	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	?
106	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	?
107	15	c.3927_3931delAAAGA	p.Glu1309fs	?
108	15	c.4163_4164insTA	p.Ser1389fs	HCEPR
109	15	c.4175C>A	p.Ser1392X	TD
110	15	c.4280delC	p.Pro1427fs	?
111	15	c.4348C>T	p.Arg1450X	PGS; TD
112	15	c.4547dupT	p.Gln1517fs	?
113	15	c.4635delA	p.Asn1546fs	O; QS
114	15	c.4666_4667insA	p.Thr1556fs	O
115	15	c.4707delT	p.Asp1569fs	PGS; QS

## CASOS NO FAMILIARES: GRANDES REORDENAMIENTOS EN APC.

116		Deleción gen completo		?
117		Deleción gen completo		?

## CASOS NO FAMILIARES: MUTACIONES BIALÉLICAS EN MUTYH.

118	7+13	c.[494A>G]+[1145G>A]	p.[Tyr165Cys]+[Gly382Asp]	?
119	7+13	c.[494A>G]+[1145G>A]	p.[Tyr165Cys]+[Gly382Asp]	?
120	7+13	c.[494A>G]+[1145G>A]	p.[Tyr165Cys]+[Gly382Asp]	PGS; CD
121	13+14	c.[1145G>A]+[1185_1186dupGG]	p.[Gly382Asp]+[Glu396GlyfsX43]	PGS; O

## CASOS NO FAMILIARES: APC/MUTYH NEGATIVOS

122	—	—	—	CG; QS
123	—	—	—	?
124	—	—	—	?
125	—	—	—	?
126	—	—	—	?
127	—	—	—	?
128	—	—	—	?
129	—	—	—	?
130	—	—	—	?
131	—	—	—	?
132	—	—	—	?
133	—	—	—	?
134	—	—	—	?
135	—	—	—	?
136	—	—	—	PGS

**Tabla S4:** Mutaciones y fenotipos en los casos con FAP clásica sin antecedentes familiares.

La nomenclatura de proteína se obtuvo del programa Alamut. IN: Intrón.

En la columna de fenotipo se incluyen datos de número de pólipos (formas profusas), y de manifestaciones extracolónicas: ?:desconocido; HCEPR: Hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina; AD: Alteraciones dentales; CD: Carcinoma duodenal; TD: Tumor desmoides; CG: Carcinoma gástrico ; H: Hepatoblastoma; Q: Queratoacantomas; L: Lipoma; O: Osteoma; PP: Forma profusa o fenotipo severo con desarrollo de más 1000 pólipos; CPT: Carcinoma papilar de tiroides; AS: Adenoma suprarrenal ; QS: Quiste sebáceo; PGS:Pólipos del tracto gastrointestinal superior .

\*Mutación recurrente clásica también nombrada como *p.K1061Kfs2*

PROTEINA	CLON	PROVEEDOR	DILUCIÓN	DESENMASCARAMIENTO
MLh1	ES05	<i>Dako</i>	1:50	PT LINK, pH9, TRIS-EDTA
Msh2	FE11	<i>Oncogene</i>	1:50	PT LINK, pH9, TRIS-EDTA
Msh6	44	<i>BD Transduction</i>	1:50	PT LINK, pH6, CITRATO
PMS2	A16-4	<i>BD Pharmigen</i>	1: 200	EDTA-H2
Hes 1	Polyclonal	<i>Santa Cruz</i>	1 :200	BOND MAX, EDTA
SMAD4	B8	<i>Santa Cruz</i>	1:50	PT LINK, pH6, CITRATO
E-CADHERIN/CDH1	4A2C7	<i>Zymed</i>	1:01	PT LINK, pH9, TRIS-EDTA
PTEN	138G6	<i>Cell Signaling</i>	1:50	PT LINK, pH9, TE
PI3KCA	C73F8 Rabbit Monoclonal	<i>Cell Signaling</i>	1 :100	PT LINK, pH9, TE
Klf4	AT4E6-monoclonal	<i>Abnova</i>	1 :100	TRIS EDTA
Bcl-2	124	<i>DAKO</i>	1:01	PT LINK, pH9, TE
CDK2 Ab-2	8D4	<i>Neo Markers</i>	1 :500	BOND MAX, EDTA
Ciclina D1	SP4 Rabbit	<i>Dako</i>	1:01	PT LINK, pH9, TE
p21 (WAF1)	EA10	<i>CALBIOCHEM</i>	1:10	PT LINK, pH6, CITRATO
p53	DO-7	<i>Dako</i>	1:01	PT LINK, pH9, TE
RB-P	G3-245	<i>BD PharMingen</i>	1 :100	PT LINK, pH9, TE
COX2/ PTGS2	SP21 Rabbit Monoclonal	<i>Neomarkers</i>	1:01	PT LINK, pH9, TE
EGFR	EGFR.113	<i>Novocastra</i>	1:10	PT LINK, pH6, CITRATO
B-CATHENIN	B-Catenin-1	<i>Dako</i>	1 :100	PT LINK, pH9, TE
CICLINA E	E6H4	<i>Mtm</i>	1:01	PT LINK, pH9, TE
hTERT	44F12	<i>Novocastra</i>	1:50	PT LINK, pH6, CITRATO
Bubr1	612502	<i>BD Biosciences</i>	1 :100	TRIS EDTA
GSK3B	ab32391	<i>Abcam</i>	1 :300	TRS High PT link
APC	C-20. sc-896	<i>Santa Cruz</i>	1 :150	—
AXIN2	ab32197	<i>Abcam</i>	1 :800	TRIS LOW PT LINK
AKT2	sc:5270	<i>Santa Cruz</i>	1 :100	TRIS High PH
TGFBR1	NCL-TGFBR1	<i>Novocastra</i>	1 :100	TRIS EDTA
GSTP1	NBP1-42011	<i>NobusBiologicals</i>	1 :1500	EDTA H2 20
C-Erb-b2	A485 Rabbit polyclonal	<i>Dako</i>	1 :400	CITRATO, pH6

**Tabla S5.** Anticuerpos utilizados en el TMA.



---





EST ESTADÍSTICOS



## COMPARACIÓN DE LOS PÓLIPOS NEGATIVOS CON EL RESTO DE PÓLIPOS

**APC+ X NEG**

**Marcador: Akt2**

**Tabla de contingencia**

Recuento

		AKT2			Total
		1,00	2,00	3,00	
APC+X	APC+	6	4	15	25
NEG	NEG	5	8	7	20
Total		11	12	22	45

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,825 <sup>a</sup>	2	,148
Razón de verosimilitudes	3,870	2	,144
Asociación lineal por lineal	1,090	1	,296
N de casos válidos	45		

a. 1 casillas (16,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,89.

**APC+ X NEG**

**Marcador: Rb**

**Tabla de contingencia**

Recuento

		RB			Total
		1,00	2,00	3,00	
APC+X	APC+	5	3	15	23
NEG	NEG	1	7	12	20
Total		6	10	27	43

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,412 <sup>a</sup>	2	,110
Razón de verosimilitudes	4,681	2	,096
Asociación lineal por lineal	,262	1	,609
N de casos válidos	43		

**NEG X MUTYH+**  
**Marcador: Cdk2**

**Tabla de contingencia**

Recuento

		CDK2			Total
		,00	1,00	2,00	
<b>NEG X MUTYH+</b>	NEG	1	16	3	20
	MUTYH	0	4	6	10
Total		1	20	9	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,600 <sup>a</sup>	2	,037
Razón de verosimilitudes	6,717	2	,035
Asociación lineal por lineal	6,144	1	,013
N de casos válidos	30		

a. 3 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,33.

**NEG X MUTYH+**  
**Marcador: Ciclina D1**

**Tabla de contingencia**

Recuento

		CICLINAD1				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
<b>NEG X MUTYH+</b>	NEG	0	16	4	0	20
	MUTYH	1	4	4	1	10
Total		1	20	8	1	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,600 <sup>a</sup>	3	,086
Razón de verosimilitudes	7,084	3	,069
Asociación lineal por lineal	1,689	1	,194
N de casos válidos	30		

**NEG X MUTYH+****Marcador: p21****Tabla de contingencia**

Recuento

		P21			Total
		,00	1,00	2,00	
<b>NEG X MUTYH+</b>	NEG	0	17	3	20
	MUTYH	2	7	1	10
Total		2	24	4	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,313 <sup>a</sup>	2	,116
Razón de verosimilitudes	4,718	2	,095
Asociación lineal por lineal	2,060	1	,151
N de casos válidos	30		

a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,67.

**NEG X MUTYH+****Marcador: Pten****Tabla de contingencia**

Recuento

		PTEN			Total
		,00	1,00	2,00	
<b>NEG X MUTYH+</b>	NEG	0	4	16	20
	MUTYH	2	1	7	10
Total		2	5	23	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,487 <sup>a</sup>	2	,106
Razón de verosimilitudes	4,920	2	,085
Asociación lineal por lineal	1,689	1	,194
N de casos válidos	30		

a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,67.

**NEG X ESPORADICOS****Marcador: Bcl2****Tabla de contingencia**

Recuento

		BCL2				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
NEG X	NEG	1	10	4	0	15
ESPOR	ESPO	1	1	3	2	7
Total		2	11	7	2	22

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,603 <sup>a</sup>	3	,055
Razón de verosimilitudes	8,486	3	,037
Asociación lineal por lineal	3,250	1	,071
N de casos válidos	22		

a. 7 casillas (87,5%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,64.

**NEG X OLIGO****Marcador: Apc****Tabla de contingencia**

Recuento

		APC				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
<b>NEG X</b>	NEG	1	3	6	7	17
<b>OLIGO</b>	OLIGO	0	6	1	0	7
Total		1	9	7	7	24

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,170 <sup>a</sup>	3	,017
Razón de verosimilitudes	11,776	3	,008
Asociación lineal por lineal	5,605	1	,018
N de casos válidos	24		

a. 7 casillas (87,5%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,29.

## NEG X OLIGO

### Marcador: Ciclina E

**Tabla de contingencia**

Recuento

		CICLINA E		Total
		,00	1,00	
<b>NEG X OLIGO</b>	NEG	11	6	17
	OLIGO	1	6	7
Total		12	12	24

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,042 <sup>a</sup>	1	,025		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	3,227	1	,072		
Razón de verosimilitudes	5,455	1	,020		
Estadístico exacto de Fisher				,069	,034
Asociación lineal por lineal	4,832	1	,028		
N de casos válidos	24				

a. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

b. La frecuencia mínima esperada es 3,50 b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

## NEG X OLIGO

### Marcador: Cox2

**Tabla de contingencia**

Recuento

		COX2			Total
		1,00	2,00	3,00	
<b>NEG X OLIGO</b>	NEG	1	6	10	17
	OLIGO	3	2	2	7
Total		4	8	12	24

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,042 <sup>a</sup>	2	,080
Razón de verosimilitudes	4,665	2	,097
Asociación lineal por lineal	3,866	1	,049
N de casos válidos	24		

a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,17.

**NEG X OLIGO****Marcador: Rb****Tabla de contingencia**

Recuento

		RB		Total
		2,00	3,00	
<b>NEG X OLIGO</b>	NEG	7	10	17
	OLIGO	0	7	7
Total		7	17	24

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,069 <sup>a</sup>	1	,044		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	2,320	1	,128		
Razón de verosimilitudes	5,940	1	,015		
Estadístico exacto de Fisher				,065	,056
Asociación lineal por lineal	3,900	1	,048		
N de casos válidos	24				

a. 3 casillas (75,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,04.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.



## COMPARACIÓN POR GRADO DE DISPLASIA

### NORMAL X ADENOMA

Marcador: Apc

Tabla de contingencia

Recuento

		APC				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
N X A	N	3	4	0	0	7
	A	1	13	16	12	42
Total		4	17	16	12	49

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	17,895 <sup>a</sup>	3	,000
Razón de verosimilitudes	17,143	3	,001
Asociación lineal por lineal	12,766	1	,000
N de casos válidos	49		

a. 5 casillas (62,5%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,57.

### NORMAL X ADENOMA

Marcador: Bcl2

Tabla de contingencia

Recuento

		BCL2				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
NORMAL X ADENOMA	N	7	0	0	0	7
	A	5	20	14	3	42
Total		12	20	14	3	49

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	25,181 <sup>a</sup>	3	,000
Razón de verosimilitudes	23,891	3	,000
Asociación lineal por lineal	14,456	1	,000
N de casos válidos	49		

a. 5 casillas (62,5%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,43.

**NORMAL X ADENOMA****Marcador: Cdk2****Tabla de contingencia**

Recuento

		CDK2			Total
		,00	1,00	2,00	
<b>NORMAL X</b>	N	5	2	0	7
<b>ADENOMA</b>	A	2	32	7	41
Total		7	34	7	48

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	21,420 <sup>a</sup>	2	,000
Razón de verosimilitudes	16,291	2	,000
Asociación lineal por lineal	14,037	1	,000
N de casos válidos	48		

a. 3 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,02.

**NORMAL X ADENOMA****Marcador: Ciclina DI****Tabla de contingencia**

Recuento

		CICLINAD1			Total
		,00	1,00	2,00	
<b>NORMAL X</b>	N	7	0	0	7
<b>ADENOMA</b>	A	2	28	10	40
Total		9	28	10	47

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	34,728 <sup>a</sup>	2	,000
Razón de verosimilitudes	30,026	2	,000
Asociación lineal por lineal	20,793	1	,000
N de casos válidos	47		

a. 3 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,34.

**NORMAL X ADENOMA****Marcador: Ciclina E****Tabla de contingencia**

Recuento

		CICLINA E		Total
		,00	1,00	
NORMAL X ADENOMA	N	7	0	7
	A	24	18	42
Total		31	18	49

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,742 <sup>a</sup>	1	,029		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	3,077	1	,079		
Razón de verosimilitudes	7,074	1	,008		
Estadístico exacto de Fisher				,038	,031
Asociación lineal por lineal	4,645	1	,031		
N de casos válidos	49				

a. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,57. b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

**NORMAL X ADENOMA****Marcador: Gsk3B****Tabla de contingencia**

Recuento

		GSK3B				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
NORMAL X ADENOMA	N	1	1	0	5	7
	A	0	0	4	35	39
Total		1	1	4	40	46

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,090 <sup>a</sup>	3	,007
Razón de verosimilitudes	9,093	3	,028
Asociación lineal por lineal	6,558	1	,010
N de casos válidos	46		

a. 6 casillas (75,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,15.

**NORMAL X ADENOMA****Marcador: Htert****Tabla de contingencia**

Recuento

		HTERT				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
<b>NORMAL X</b>	N	0	2	2	3	7
<b>ADENOMA</b>	A	3	0	4	35	42
Total		3	2	6	38	49

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	15,545 <sup>a</sup>	3	,001
Razón de verosimilitudes	11,563	3	,009
Asociación lineal por lineal	2,568	1	,109
N de casos válidos	49		

a. 5 casillas (62,5%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,29.

**NORMAL X ADENOMA****Marcador: Msh2****Tabla de contingencia**

Recuento

		MSH2		Total
		2,00	3,00	
<b>NORMAL X</b>	N	2	5	7
<b>ADENOMA</b>	A	0	42	42
Total		2	47	49

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,511 <sup>a</sup>	1	,000		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	6,277	1	,012		
Razón de verosimilitudes	8,336	1	,004		
Estadístico exacto de Fisher				,018	,018
Asociación lineal por lineal	12,255	1	,000		
N de casos válidos	49				

a. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,29. b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

**NORMAL X ADENOMA****Marcador: p53****Tabla de contingencia**

Recuento

		P53				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
<b>NORMAL X</b>	N	5	2	0	0	7
<b>ADENOMA</b>	A	6	26	7	3	42
Total		11	28	7	3	49

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,561 <sup>a</sup>	3	,009
Razón de verosimilitudes	10,623	3	,014
Asociación lineal por lineal	7,471	1	,006
N de casos válidos	49		

a. 5 casillas (62,5%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,43.

**NORMAL X ADENOMA****Marcador: Pms2****Tabla de contingencia**

Recuento

		PMS2			Total
		1,00	2,00	3,00	
<b>NORMAL X</b>	N	0	2	5	7
<b>ADENOMA</b>	A	1	1	40	42
Total		1	3	45	49

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,259 <sup>a</sup>	2	,027
Razón de verosimilitudes	4,977	2	,083
Asociación lineal por lineal	2,038	1	,153
N de casos válidos	49		

a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,14.

**ADENOMA X A. ALTO****Marcador: Gsk3B****Tabla de contingencia**

Recuento

		GSK3B			Total
		1,00	2,00	3,00	
<b>ADENOMA X</b>	A	0	4	35	39
	A. ALTO	2	6	6	14
Total		2	10	41	53

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	14,302 <sup>a</sup>	2	,001
Razón de verosimilitudes	13,602	2	,001
Asociación lineal por lineal	14,016	1	,000
N de casos válidos	53		

a. 3 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,53.

**ADENOMA X A. ALTO****Marcador: Htert****Tabla de contingencia**

Recuento

		HTERT				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
<b>ADENOMA X</b>	A	3	0	4	35	42
	A. ALTO	2	4	2	6	14
Total		5	4	6	41	56

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	15,172 <sup>a</sup>	3	,002
Razón de verosimilitudes	14,476	3	,002
Asociación lineal por lineal	7,715	1	,005
N de casos válidos	56		

a. 6 casillas (75,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,00.

**ADENOMA X A. ALTO****Marcador: Msh2****Tabla de contingencia**

Recuento

		MSH2		Total
		2,00	3,00	
<b>ADENOMA X</b>	A	0	42	42
	A. ALTO	2	12	14
Total		2	54	56

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,222 <sup>a</sup>	1	,013		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	2,765	1	,096		
Razón de verosimilitudes	5,773	1	,016		
Estadístico exacto de Fisher				,059	,059
Asociación lineal por lineal	6,111	1	,013		
N de casos válidos	56				

a. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,50. b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

**ADENOMA X A. ALTO****Marcador: Msh6****Tabla de contingencia**

Recuento

		MSH6			Total
		1,00	2,00	3,00	
<b>ADENOMA X</b>	A	3	3	36	42
	A. ALTO	6	2	6	14
Total		9	5	42	56

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,505 <sup>a</sup>	2	,003
Razón de verosimilitudes	10,344	2	,006
Asociación lineal por lineal	11,299	1	,001
N de casos válidos	56		

a. 3 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,25.

**ADENOMA X A. ALTO****Marcador: p21****Tabla de contingencia**

Recuento

		P21				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
<b>ADENOMA X</b>	<b>A</b>	0	33	7	2	42
	<b>A. ALTO</b>	2	7	5	0	14
Total		2	40	12	2	56

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	9,644 <sup>a</sup>	3	,022
Razón de verosimilitudes	9,583	3	,022
Asociación lineal por lineal	,071	1	,790
N de casos válidos	56		

a. 5 casillas (62,5%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,50.

**ADENOMA X A. ALTO****Marcador: Pms2****Tabla de contingencia**

Recuento

		PMS2			Total
		1,00	2,00	3,00	
<b>ADENOMA X</b>	<b>A</b>	1	1	40	42
	<b>A. ALTO</b>	0	3	11	14
Total		1	4	51	56

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,987 <sup>a</sup>	2	,050
Razón de verosimilitudes	5,301	2	,071
Asociación lineal por lineal	1,602	1	,206
N de casos válidos	56		

a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,25.



**ADENOMA X A. ALTO****Marcador: Pten****Tabla de contingencia**

Recuento

		PTEN		Total
		1,00	2,00	
<b>ADENOMA X A. ALTO</b>	A	2	40	42
	AA	3	11	14
Total		5	51	56

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,587 <sup>a</sup>	1	,058		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	1,830	1	,176		
Razón de verosimilitudes	3,069	1	,080		
Estadístico exacto de Fisher				,094	,094
Asociación lineal por lineal	3,523	1	,061		
N de casos válidos	56				

a. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,25. b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

**A.ALTO X CARCINOMA****Marcador: Bcl2****Tabla de contingencia**

Recuento

		BCL2			Total
		,00	1,00	2,00	
<b>A.ALTO X CARCINOMA</b>	AA	4	7	3	14
	C	12	2	2	16
Total		16	9	5	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,875 <sup>a</sup>	2	,032
Razón de verosimilitudes	7,196	2	,027
Asociación lineal por lineal	3,911	1	,048
N de casos válidos	30		

a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,33.

**A.ALTO X CARCINOMA****Marcador: beta catenina nuclear****Tabla de contingencia**

Recuento

		bcatnuc				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
A.ALTO X CARCINOMA	AA	9	2	2	1	14
	C	2	6	5	3	16
Total		11	8	7	4	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,645 <sup>a</sup>	3	,034
Razón de verosimilitudes	9,153	3	,027
Asociación lineal por lineal	5,472	1	,019
N de casos válidos	30		

a. 6 casillas (75,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,87.

**A.ALTO X CARCINOMA****Marcador: Cdk2****Tabla de contingencia**

Recuento

		CDK2			Total
		,00	1,00	2,00	
A.ALTO X CARCINOMA	AA	0	9	4	13
	C	2	5	9	16
Total		2	14	13	29

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,807 <sup>a</sup>	2	,090
Razón de verosimilitudes	5,594	2	,061
Asociación lineal por lineal	,313	1	,576
N de casos válidos	29		

a. 2 casillas (33,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,90.

**A.ALTO X CARCINOMA****Marcador: Klf4****Tabla de contingencia**

Recuento

		KLF4		Total
		,00	1,00	
A.ALTO X CARCINOMA	AA	4	10	14
	C	15	1	16
Total		19	11	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13,659 <sup>a</sup>	1	,000		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	10,997	1	,001		
Razón de verosimilitudes	15,197	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	13,204	1	,000		
N de casos válidos	30				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5,13. b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

**A.ALTO X CARCINOMA****Marcador: Smad4****Tabla de contingencia**

Recuento

		SMAD4				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
A.ALTO X CARCINOMA	AA	0	1	2	11	14
	C	8	3	3	2	16
Total		8	4	5	13	30

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	15,366 <sup>a</sup>	3	,002
Razón de verosimilitudes	19,064	3	,000
Asociación lineal por lineal	14,432	1	,000
N de casos válidos	30		

a. 6 casillas (75,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,87.

---



UESTIONARIO  
Y  
ONSENTIMIENTOS



## CUESTIONARIO PACIENTES PAF

### Nº DE FAMILIA

### CASO ÍNDICE (PROBANDO)

1er Apellido

2º Apellido

Nombre

Fecha nacimiento

Lugar de nacimiento

Motivo de la consulta

Remitido por

### ÁRBOL FAMILIAR

- Indicar:
- 1) familiares con pólipos
  - 2) familiares con cáncer colorrectal
  - 3) familiares con manifestaciones extracolónicas
  - 4) familiares con cirugía terapéutica / profiláctica
  - 5) familiares estudiados con colonoscopia y resultado de la misma
  - 6) familiares afectados con otros tipos de cáncer
- En los puntos 1, 2, 3 y 4 RELLENAR a continuación

### PÓLIPOS

#### NOMBRE DEL AFECTADO:

Nº de pólipos

- 1 > 100
- 2 31 - 100
- 3 31-100/múltiples
- 4 11-30
- 5 Múltiples
- 6 Muy abundantes
- 7 Numerosos
- 8 Varios
- 99 Desconocido

Localización de los pólipos

- 1 Sigma
- 2 Todo el colon
- 3 colon descendente
- 9 Desconocido

Tipo de pólipos

- 1 Pólipo adenomatoso
- 2 Pólipo tubulo-velloso
- 3 Adenoma tubular
- 4 Planos
- 9 Desconocido

Grado de displasia (el más alto)

- 1 Leve
- 2 Moderada
- 3 Severa
- 9 Desconocido

Fecha del diagnóstico de pólipos

Edad al diagnóstico de pólipos

Lugar y fecha donde ha sido atendido o intervenido

## AFECTACIÓN EXTRACOLÓNICA

### NOMBRE DEL AFECTADO:

Manifestaciones extracolónicas

- 1 Sí
- 2 No
- 9 Desconocido

Tumores desmoides

- 1 Sí      Edad diagnóstico
- 2 No
- 9 Desconocido

Pólipos gástricos

- 1 Sí      Edad diagnóstico
- 2 No
- 9 Desconocido

Pólipos duodenales

- 1 Sí      Edad diagnóstico
- 2 No
- 9 Desconocido

Osteomas

- 1 Sí      Edad diagnóstico
- 2 No
- 9 Desconocido

Tumor tiroideo

- 1 Sí      Edad diagnóstico
- 2 No
- 9 Desconocido

HCEPR

- 1 Sí      Edad diagnóstico
- 2 No
- 9 Desconocido

Otros

- 1 No
- 2 diente supernumerario      Edad diagnóstico
- 3 Neo.duodenal '87      Edad diagnóstico



4	quistes sebáceos	Edad diagnóstico
5	quiste óseo	Edad diagnóstico
6	Dermatofibromas	Edad diagnóstico
7	Neo.mama, neo.vejiga, ampuloma	Edad diagnóstico
8	Otros (especificar)	Edad diagnóstico

Lugar y fecha donde ha sido atendido o intervenido

## **CÁNCER COLORRECTAL (CCR)**

### **NOMBRE DEL AFECTADO:**

Cáncer colorrectal

- 1 Sí
- 2 No
- 9 Desconocido

Localización

Fecha diagnóstico del CCR

Edad diagnóstico del CCR

¿El diagnóstico fue posterior al de la poliposis?

- 1 Sí
- 2 No
- 9 No CCR

Histología CCR

- 1 Adenocarcinoma
- 2 Adenocarcinoma bien diferenciado
- 3 Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
- 4 Adenocarcinoma poco diferenciado
- 5 Carcinoma indiferenciado
- 6 Adenocarcinoma in situ
- 7 Adenocarcinoma mucinoso
- 8 Otros
- 99 Desconocido

Grado histológico del CCR

- 1 GI
- 2 GII
- 3 GII/III
- 4 GIII
- 5 GIII/IV
- 6 GIV
- 9 Desconocido

**T**

- 1 Tis
- 2 T1
- 3 T2
- 4 T3
- 5 T4
- 9 Desconocido

**N**

- 1 NO
- 2 N1
- 3 N2
- 4 N3
- 9 Desconocido

**M**

- 1 MO
- 2 M1 Hepáticas
- 3 M1 Pulmonares
- 4 M1 Óseas
- 5 M1 Varias localizaciones
- 9 Desconocido

## Invasión vascular

- 1 Sí
- 2 No
- 9 Desconocido

## Infiltración linfocitaria

- 1 Sí
- 2 No
- 9 Desconocido

## Estadio Dukes-Astler

- 1 A. T limitado a mucosa y submucosa
- 2 B1. T invade musc propia, sin sobrepasarla totalm/
- 3 B2. T invade completa/ musc propia y/o serosa
- 4 C1. Dukes B1 + invasión ganglionar
- 5 C2. Dukes B2 + invasión ganglionar
- 6 D. Metástasis a distancia
- 7 B3. Invade serosa u órganos contiguos
- 9 Desconocido

## Lugar y fecha donde ha sido atendido o intervenido

**CIRUGÍA TERAPÉUTICA / PROFILÁCTICA****NOMBRE DEL AFECTADO:**

## Cirugía terapéutica

- 1 Sí
- 2 No
- 9 Desconocido

## Tipo de cirugía terapéutica/profiláctica

- 1 colectomía total
- 2 Colectomía total con reservorio
- 3 Colectomía total sin reservorio
- 4 Colectomía total + IRA
- 5 Colectomía total + operación de Miles
- 6 Colectomía subtotal
- 7 Colectomía subtotal con reservorio
- 8 Hemicolectomía izquierda
- 9 Proctectomía total con reservorio
- 10 Resección anterior del recto
- 11 Colectomía parcial

- 12 Hemicolectomía derecha
- 99 Desconocido

Lugar y fecha donde ha sido atendido o intervenido

	<p align="center"><b><u>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</u></b> <b><u>PARA DIAGNÓSTICO GENÉTICO</u></b></p>	<p>PT CNIO 04/01 Anexo VI CI CF Rev1 – Diciembre 2010 Pág 1 de 3</p>
---	---	--

### Finalidad y descripción del proceso

Este documento tiene por objeto informarle y solicitar su consentimiento escrito para someterse a un estudio diagnóstico de susceptibilidad genética para el desarrollo de tumores; estudio que se llevará a cabo por el personal facultativo de la Consulta de Cáncer Familiar del Hospital Universitario de Fuenlabrada (HUF) y del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) valorando su riesgo genético, y por el Programa de Genética del Cáncer Humano (PGCH) del CNIO que realizará los estudios diagnósticos correspondientes en la muestra que se le extraiga.

Los síndromes de cáncer hereditario tienen importantes implicaciones a nivel individual, familiar y social, ya que las personas portadoras de mutaciones tienen un riesgo mayor para desarrollar tumores que el de la población general. Es en estos síndromes donde las posibilidades de prevención, o al menos de detección temprana, son más altas, al poder identificar a los portadores de estas mutaciones antes de que hayan desarrollado la enfermedad.

Conforme se le ha explicado, los motivos por los que se aconseja que se someta al presente estudio diagnóstico de susceptibilidad es la ocurrencia de alguno/s de los siguientes supuestos:

- Agregación de tumores en la familia
- Aparición de tumores a una edad temprana
- Bilateralidad / multifocalidad de los tumores.
- Aparición de los tumores asociados a malformaciones o defectos congénitos.
- Varios tumores primarios en un mismo individuo.

En la actualidad las personas con riesgo elevado por ser portadoras de un gen alterado pueden ser controladas y seguidas por su médico de una forma más minuciosa y continuada. Junto a las medidas de detección precoz, en algunos casos concretos podrán aplicarse otras medidas de reducción del riesgo mediante quimioprevención y cirugía profiláctica.

### ¿En qué consiste el estudio de diagnóstico genético a realizar?

El objetivo del presente estudio diagnóstico de susceptibilidad genética es analizar los genes que están implicados en la enfermedad

para lo cual se utilizarán, en la muestra de sangre que se le extraerá, las técnicas de citogenética y de biología molecular necesarias para el diagnóstico genético pretendido. En principio, dicha extracción de sangre se llevará a cabo mediante venopunción. Dicha técnica implica una serie de riesgos, normalmente menores y poco frecuentes, entre los que se destacan los siguientes:

- Sangrado excesivo
- Desmayo o sensación de mareo
- Hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel)
- Infección (un riesgo leve en cualquier momento que se presente ruptura de la piel)
- Punciones múltiples para localizar las venas

Igualmente, junto con la extracción de la muestra de sangre mencionada, para el estudio diagnóstico pretendido, es necesario (en ocasiones) el análisis de la/s muestra/s de su tumor o del de su/s familiar/es; por ello, solicitamos su consentimiento para disponer de las mismas si fuera necesario. En el caso de que usted haya sido diagnosticado de algún tumor previamente, y para la consecución del presente estudio diagnóstico de susceptibilidad genética sobre su persona y familia, con la firma del presente documento consiente expresamente la utilización del tejido del tumor sobre el que se llevó a cabo su diagnóstico.

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, c/ Melchor Fdez. Almagro 3, 28029 MADRID  
Teléfonos: + (34) 917 328 000 + (34) 912 246 900 ; Fax: + (34) 912 246 980; web: [www.cnio.es](http://www.cnio.es)

	<p align="center"><b><u>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</u></b> <b><u>PARA DIAGNÓSTICO GENÉTICO</u></b></p>	<p>PT CNIO 04/01 Anexo VI CI CF Rev1 – Diciembre 2010 Pág 2 de 3</p>
---	---	--

### Consejo Genético

Conforme exige la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2207), nos comprometemos a suministrarle consejo genético tras los análisis realizados. Dicho consejo genético consiste en informarle de las posibles consecuencias para usted, sus descendientes y otros familiares de los resultados obtenidos, así como de los riesgos y, en su caso, las distintas alternativas preventivas existentes.

Sin embargo, es posible que de dicho estudio diagnóstico de susceptibilidad genética no se derive ningún resultado concluyente acerca de la patología consultada, debido al conocimiento incompleto de las bases genéticas de la enfermedad o al elevado número de genes implicados.

En todo caso, dado que el presente consentimiento informado va referido a una prueba diagnóstica, usted será informado del resultado de la misma, salvo que con anterioridad nos exprese su voluntad en contrario.

El presente estudio diagnóstico de susceptibilidad genética para el desarrollo de tumores puede comportar igualmente, información genética relevante respecto de sus familiares, correspondiéndole a Usted, conforme establece el artículo 47.5 de la Ley de Investigación Biomédica, decidir si desea que dicha información les sea o no transmitida.

En todo caso, antes de decidir sobre esta cuestión, es conveniente que sepa que, cualquiera que sea su opción, de acuerdo con lo dispuesto por la misma Ley, puede acordarse, según criterio del médico responsable del estudio, y con el fin de evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, informarles. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades y, además, ello se decidirá previa consulta con el comité asistencial si lo hubiera.

En el caso de obtenerse información genética relevante para sus familiares, ¿autoriza Usted a que se le comunique dicha información?:

☐

SI

☐

NO

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma del representante legal

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo

	<b><u>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</u></b> <b><u>PARA DIAGNÓSTICO GENÉTICO</u></b>	PT CNIO 04/01 Anexo VI CI CF Rev1 – Diciembre 2010 Pág 3 de 3
---	--	---

**Confidencialidad**

Los datos personales que se recojan sobre Usted, incluidos aquellos que se soliciten adicionalmente conforme a la necesidad del estudio genético que nos ocupa, únicamente serán tratados y accedidos por el personal médico y sanitario que realizará el estudio. Dicha información será confidencial y procesada de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación vigente, con la finalidad diagnóstica y de seguimiento médico descrita a lo largo del presente documento, pudiendo ejercer en cualquier momento, los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, poniéndose para ello en contacto con la presente Consulta de Cáncer Familiar.

Por último, se informa que los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica, si bien, en dicha publicación se guardará absoluta confidencialidad de su identidad.

He sido informado adecuadamente de los puntos anteriores y de los temas que de ellos se han derivado, así como he podido resolver cuantas dudas me han surgido, por el Dr. \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

\_\_\_\_\_  
El facultativo de la Consulta de Cáncer Familiar

\_\_\_\_\_  
Nombre del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma del representante legal

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo


(En caso de familiar fallecido)

☐ Consiento la disposición de la muestra de tumor de mi familiar (filiación): \_\_\_\_\_, para completar estudio diagnóstico genético.

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Firma del representante legal

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo

	<p align="center"><b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA - ESTUDIOS GENÉTICOS</b></p>	<p align="right">PT CNIO 04/01 Anexo V CI Rev2 – Diciembre 2010 Pág 1 de 4</p>
---	---	--

### Finalidad y descripción del proceso

Usted ha consentido que por los facultativos de la Unidad de Cáncer Familiar del HUF se disponga de parte del tejido de su tumor, extraído con fines diagnósticos y/o terapéuticos, y ello en relación con el estudio diagnóstico predictivo genético al que se va a someter su familiar.

El presente documento tiene como objeto, conforme regula la Ley 14/2007, de 13 de diciembre, de Investigación Biomédica, solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de parte de la muestra sobrante de tejido del tumor a analizar en el estudio de predisposición genética al que se va a someter a su familiar directo.

Dicha donación tiene como fin la utilización de dicho sobrante en investigación biomédica relacionada con el cáncer, concretamente en estudios genéticos, e incorporar su muestra a un Biobanco (Tejido de tumor) que existe en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea necesarias al respecto.

El Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) fue creado en 1998 por el Instituto de Salud Carlos III dependiente del Ministerio de Sanidad. La misión esencial del CNIO es llevar a cabo una investigación de excelencia y ofrecer tecnología innovadora en el ámbito del cáncer al Sistema Nacional de Salud. El CNIO es uno de los pocos centros oncológicos europeos que destina sus recursos a investigación básica y aplicada ya que tiene una especial preocupación en conseguir que los avances obtenidos en la investigación sobre el cáncer puedan trasladarse lo antes posible a la práctica clínica, de modo que el paciente oncológico sea el principal beneficiario de nuestro esfuerzo investigador.

El avance de la ciencia y de la medicina exigen que se realice investigación sobre tejidos o sangre humana, tanto sana como patológica. Dicho avance resulta especialmente importante en el ámbito del cáncer, ya que se trata de la segunda causa de mortalidad en el mundo.

La principal vía de obtener dichos tejidos de tumor o sangre que permitan la investigación biomédica son las muestras sobrantes de las extracciones que se hacen con fines diagnósticos. Parte de la muestra de tejido de tumor o sangre no es necesaria para el correspondiente estudio y para establecer un diagnóstico y por ello, es normalmente destruida.

El objeto de esta donación, es su utilización en investigaciones biomédicas relacionadas con el cáncer, quedando incorporada a un Biobanco (Tejido de tumor), dotando a los investigadores de tejido para que puedan desarrollar avances en el terreno del conocimiento sobre el cáncer, en particular sobre su aparición, evolución y tratamiento.

El consentimiento que ahora presta no supone para usted ningún riesgo o molestia adicional ya que únicamente va a autorizar la investigación con muestras sobrantes de tejido de tumor, que de otra forma se desecharían, y su incorporación a un Biobanco (Tejido de tumor).


La donación de este sobrante de tejido de tumor y los datos asociados es voluntaria por lo que, si Ud. da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo. En caso de producirse esta revocación ello no supondrá ningún cambio en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico /tratamiento y/o seguimiento.

En caso de revocación su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma. La parte de muestra que no haya sido utilizada, en el momento de ejercer este derecho, podrá ser anonimizada (si tenía datos asociados) utilizándose en otros proyectos con fines similares y siempre con aprobación previa del correspondiente Comité de Ética para su uso, o podrá ser destruida. La opción aplicada será la que Ud. elija en el correspondiente documento de revocación.

### Carácter altruista de la donación

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta



	<b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA - ESTUDIOS GENÉTICOS</b>	PT CNIO 04/01 Anexo V CI Rev2 – Diciembre 2010 Pág 2 de 4
---	---	---

investigación. En todo caso, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea, lógicamente, renunciabile.

Sin embargo, los estudios llevados a cabo pueden tener beneficio para su persona o la de sus familiares, y en todo caso los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de la muestra incorporada al Biobanco (Tejido de tumor) y de los resultados de la investigación corresponderá al CNIO y, en su caso, al investigador. Las muestras podrán ser cedidas a otros grupos de investigación bajo acuerdos de colaboración y siempre para la investigación biomédica del cáncer.

Asimismo, y para poder completar un proyecto de investigación, cabe la posibilidad de que sea necesario requerir nuevamente su consentimiento para solicitarle una nueva muestra de tejido de tumor (en el caso de ser posible) toda vez que la viabilidad de la presente investigación científica pueda requerirlo, así como contactar nuevamente con usted para solicitarle nueva información adicional a la ya facilitada.

#### Protección de datos y confidencialidad

Los datos personales que se recojan sobre Usted, incluidos aquellos que se soliciten adicionalmente al hospital conforme a la necesidad de la investigación que nos ocupa y siempre bajo su autorización, serán confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose los mismos únicamente de acuerdo con los objetivos descritos en el presente documento, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial, teniendo únicamente acceso a dicha información el personal investigador autorizado, colaboradores del mismo y las autoridades sanitarias correspondientes. Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

En el momento que usted consienta el uso de excedente de muestra para los fines de investigación aplicada descritos, dicho excedente será sometido a un proceso de disociación. Es decir, sólo será identificado por un número y/o un código constando todos sus datos debidamente codificados. Sólo con el fin de poder realizar la valoración genética por parte de los investigadores principales, y de poderle aportar la información genéticamente relevante que de ella se pueda concluir para Ud. o sus familiares.

De igual modo, sus datos personales serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, cuya titularidad corresponde al CNIO, con la finalidad de gestionar el proyecto de investigación descrito en el presente consentimiento, puediendo ejercer en cualquier momento, los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, poniéndose para ello en contacto con el Centro en la siguiente dirección:


Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas,  
Att Secretaría de Dirección,  
c/ Melchor Fernández Almagro, 3 (28029) de Madrid.

#### Información sobre resultados del estudio

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio / proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo. Siempre podrá consultar en nuestra página web o solicitarnos los resultados generales del Proyecto en el que Ud participa. Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para Ud.

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, c/ Melchor Fdez. Almagro 3, 28029 MADRID  
Teléfonos: + (34) 917 328 000 + (34) 912 246 900 ; Fax: + (34) 912 246 980; web: [www.cnio.es](http://www.cnio.es)



	<b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA - ESTUDIOS GENÉTICOS</b>	PT CNIO 04/01 Anexo V CI Rev2 – Diciembre 2010 Pág 3 de 4
---	---	---

Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser tanto clínicos como genéticamente relevantes para Ud. e interesar a su salud o a la de su familia, le corresponde a Ud. decidir si quiere recibir o no dicha información, tanto en relación con su persona como con su familia, para lo que deberá cumplimentar el apartado que se recoge más adelante en relación a dicho extremo.

En el caso de que Ud. haya optado por no recibir dicha información y, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta del comité asistencial si lo hubiera. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.

En cualquier caso, los resultados de las investigaciones llevadas a cabo, y conforme a la normativa vigente, se harán públicos mediante su difusión y posterior publicación en prensa científica, sin que se facilite ningún dato que le identifique o pueda llegar a identificarle.


Sin embargo, y de conformidad con la normativa vigente, el CNIO, una vez obtenidos y evaluados los resultados de los análisis realizados, se compromete a suministrarle consejo genético, es decir, informarle sobre las posibles consecuencias tanto para usted como para sus descendientes de los resultados de los referidos análisis o cribados genéticos realizados, así como de sus ventajas y riesgos. Por otro lado, para el caso de que puedan contemplarse cualquier alternativa derivada de los citados análisis, el CNIO se compromete a asesorarle en relación a dichas alternativas en el que así concurran. Tal consejo y asesoramiento genético se llevará a cabo SALVO QUE USTED INDIQUE LO CONTRARIO.

#### La muestra

La muestra formará parte de un Biobanco (Tejido de tumor) hasta su uso en el proyecto de investigación, pudiendo ser cedida a otros investigadores, los que a su vez podrán realizar ensayos relacionados con la finalidad para la que Ud. haya donado la muestra. El acceso de estos investigadores a sus datos solo tendrá lugar en los casos estrictamente necesarios para el desarrollo de su investigación dado que la finalidad siempre serán estudios genéticos.

Su muestra solo será utilizada en proyectos que obtengan la pertinente valoración positiva del correspondiente Comité de Ética

Le Agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento del cáncer.

	<p align="center"><b>DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA - ESTUDIOS GENÉTICOS</b></p>	<p align="right">PT CNIO 04/01 Anexo V CI Rev2 – Diciembre 2010</p>
		<p align="right">Pág 4 de 4</p>

Persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento

Nombre  
En calidad de

Datos del participante/paciente

Nombre  
DNI

1. Declaro, bajo mi responsabilidad, que he leído la Hoja de Información al Participante (págs 1-3 de este documento) y acepto ceder al CNIO tanto el sobrante de mi muestra diagnóstica como de tumor en su caso, para investigación biomédica sobre el cáncer.
2. Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al Participante (pág 1-3 de este documento) y una copia de este Consentimiento Informado (pág 4, actual, de este documento), fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo de la donación.
3. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
4. Sé que se mantendrá la confidencialidad de mis datos.
5. El consentimiento lo otorgo de manera voluntaria y sé que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento del mismo, por cualquier razón y sin que tenga ningún efecto sobre mi tratamiento médico futuro.

SÍ DOY ☐ Mi consentimiento  
NO DOY ☐ Mi consentimiento

AUTORIZACION A LA INFORMACIÓN DE RESULTADOS DERIVADOS DEL ESTUDIO		
Autorizo a informar sobre datos adicionales de mi historia clínica siempre que sean necesarios para el desarrollo de la investigación	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
Autorizo que se me comunique la información relevante para mi persona o la de mis familiares derivada de la investigación	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
Autorizo a ser contactado en el caso que se necesite información adicional para el proyecto.	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>

Fecha

Firma del participante/paciente

Firma del representante legal

Firma del testigo

Hago constar que he explicado las características y el objetivo del estudio y sus riesgos y beneficios potenciales a la persona cuyo nombre aparece escrito más arriba. Esta persona otorga su consentimiento por medio de su firma fechada en este documento

Fecha

(Nombre y firma de la persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento)



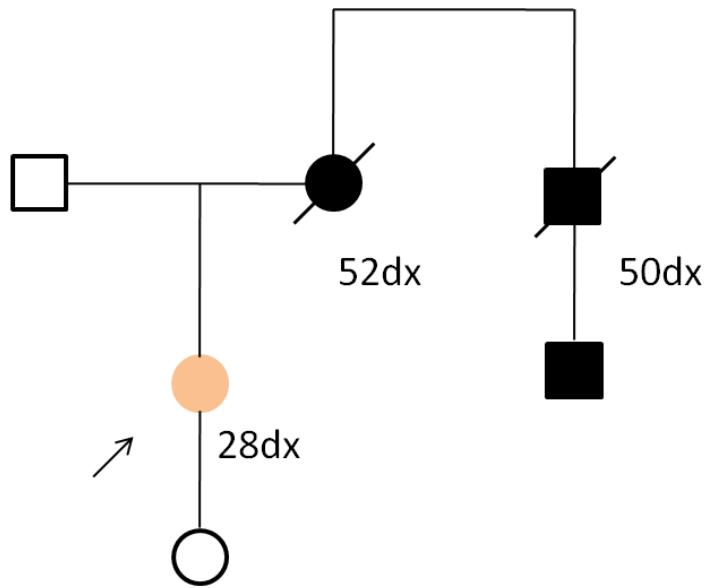
---



ÁRBOLES FAMILIARES



341C

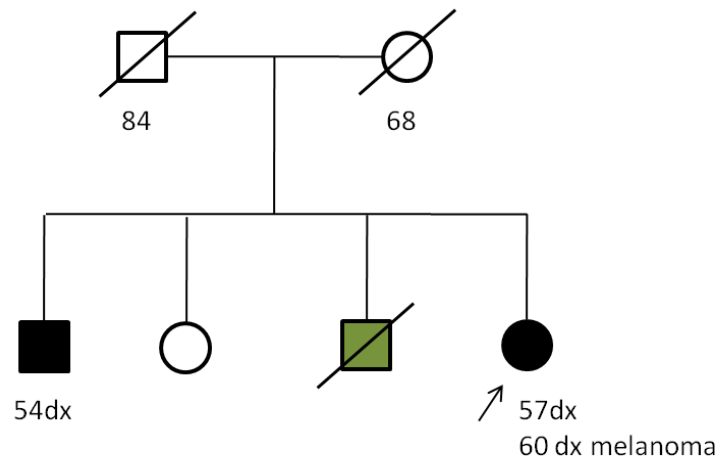


■ PAF/CCR

● PAF/CCR y S Gardner

**Figura 1:** Árbol Familia 341C

965C

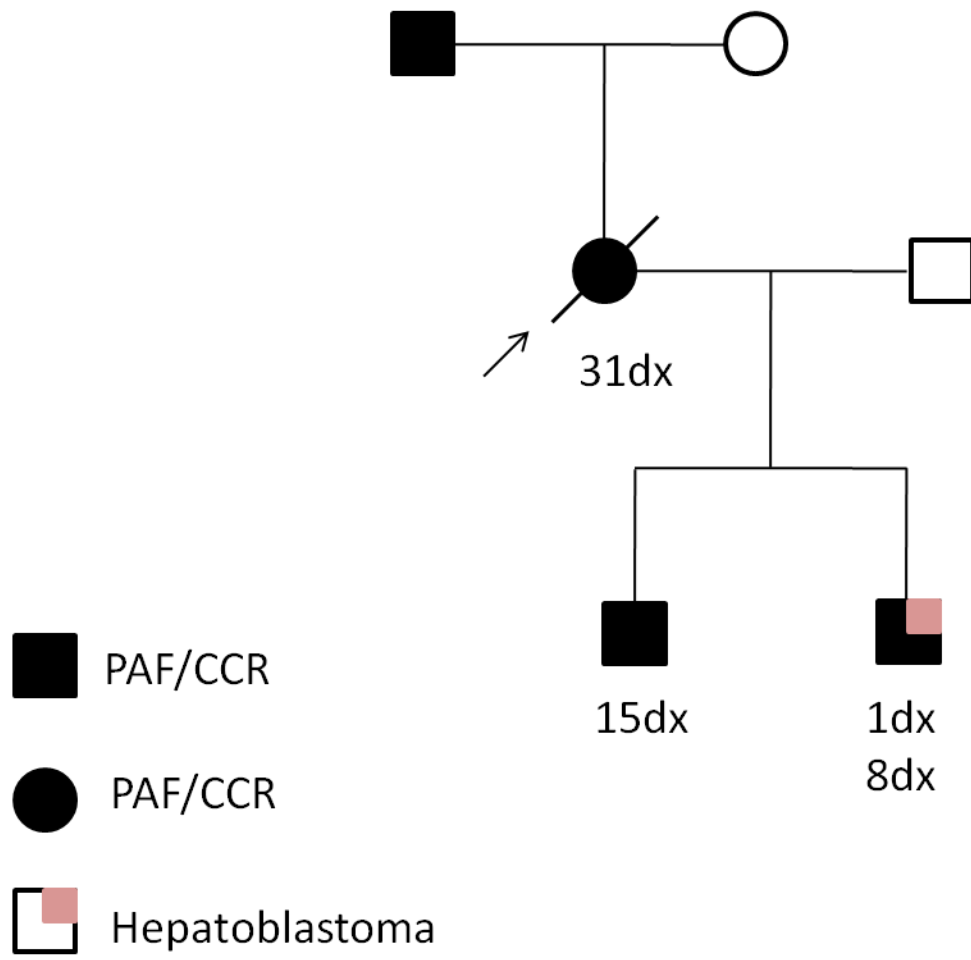


■ C. laringe

■ PAF/CCR

**Figura 2:** Árbol Familia 965C

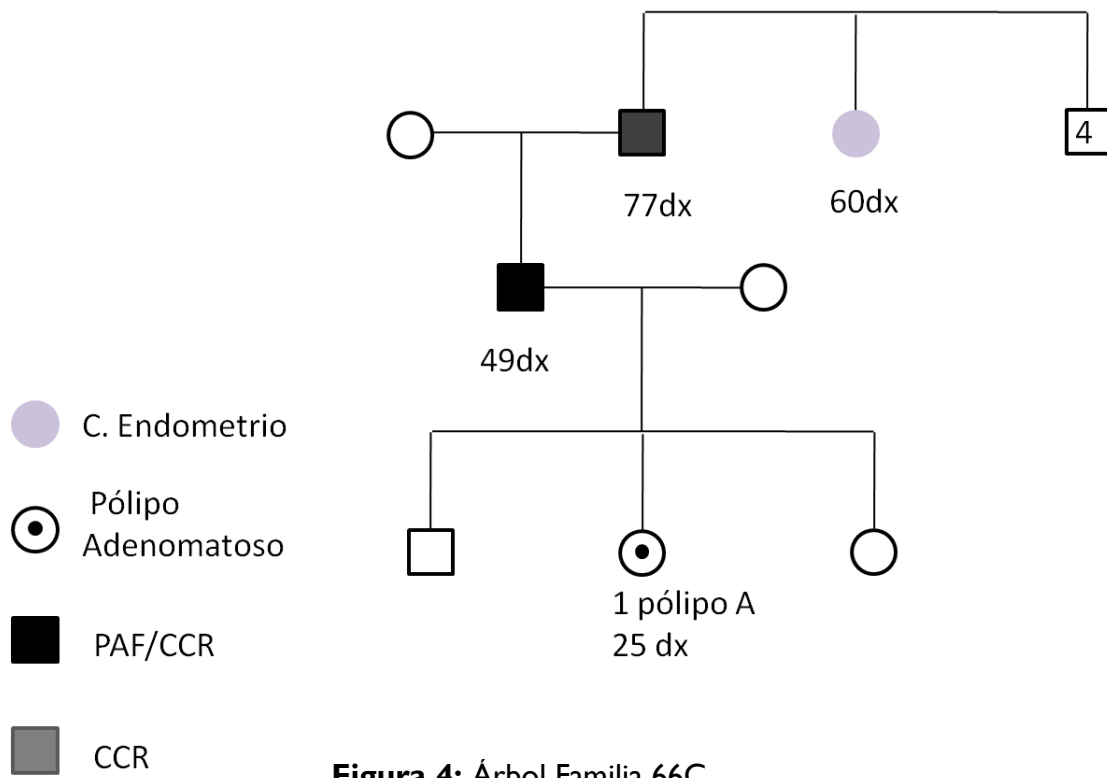
511C



**Figura 3:** Árbol Familia 511C

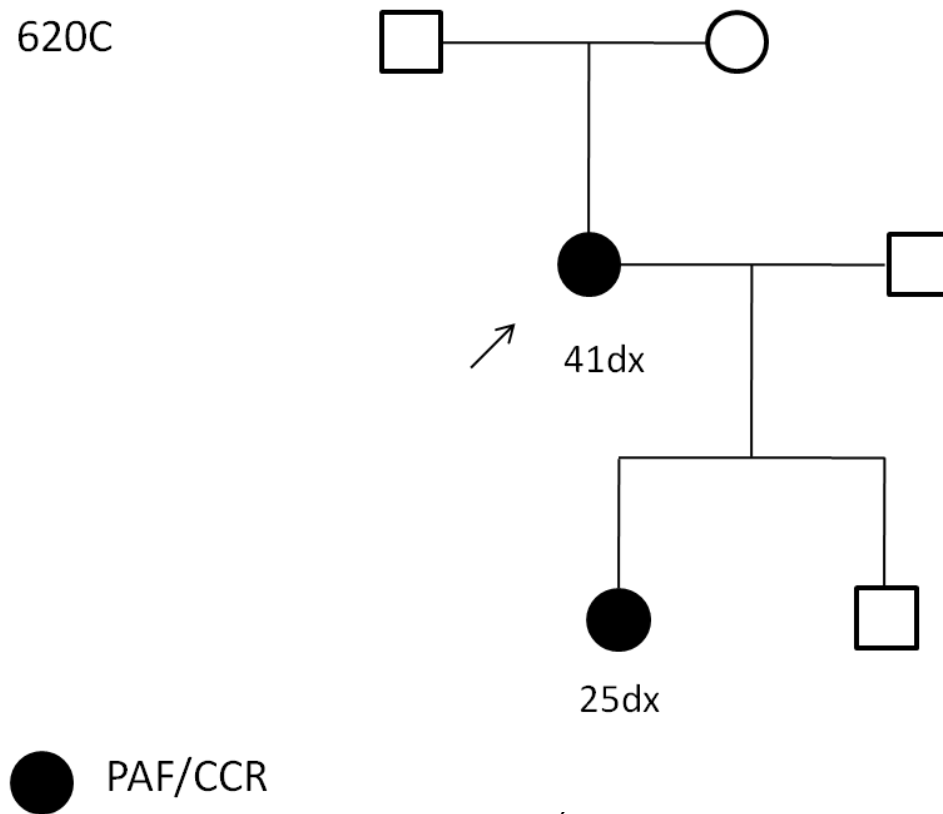


66c



**Figura 4:** Árbol Familia 66C

620C



**Figura 5:** Árbol Familia 620C

221C

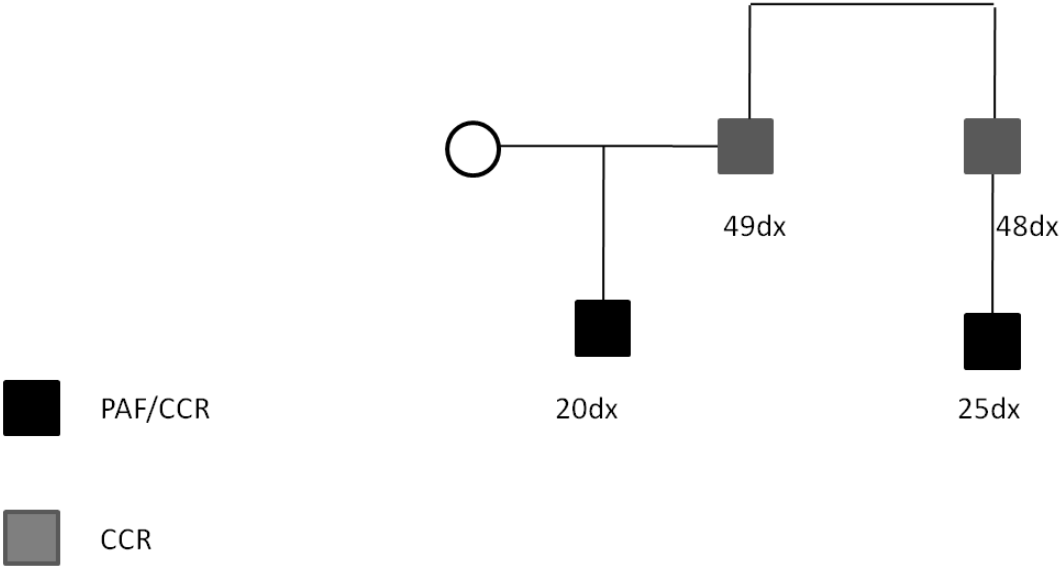


Figura 6: Árbol Familia 221C

679C

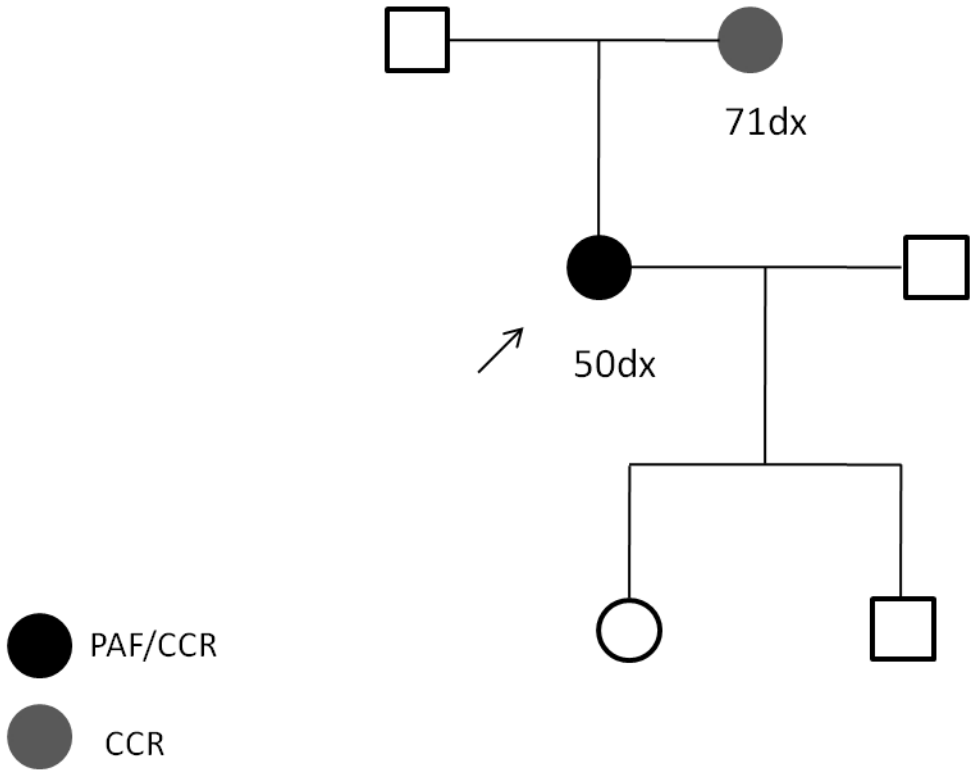


Figura 7: Árbol Familia 679C

105C

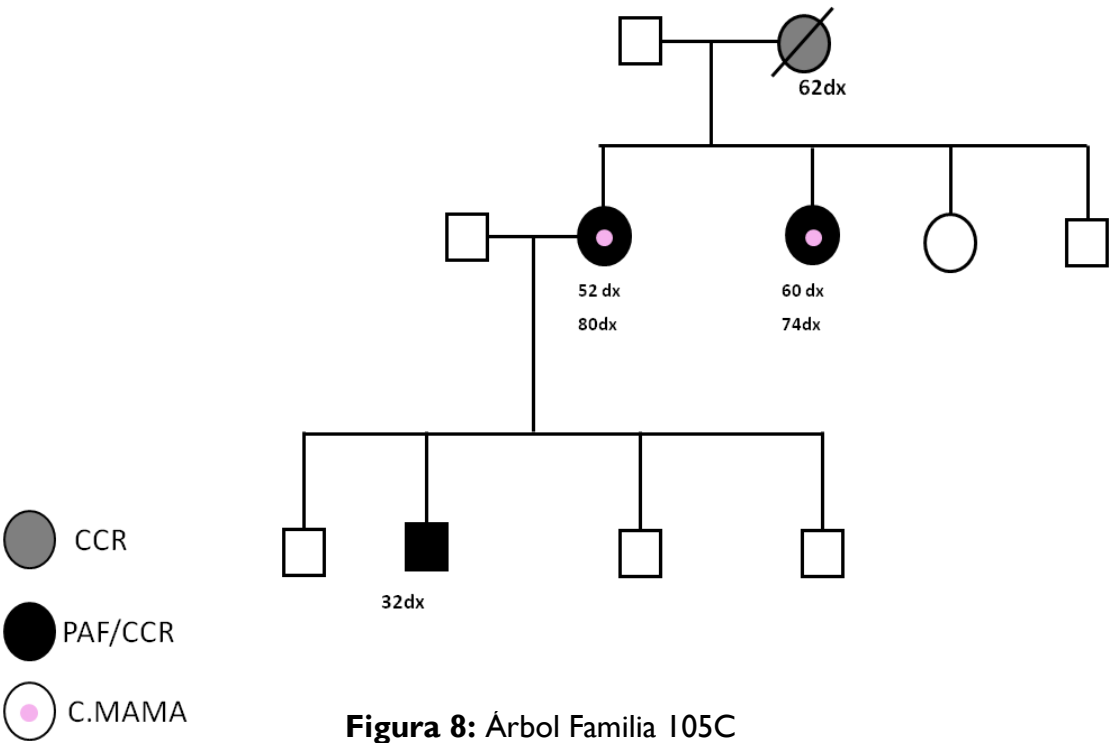


Figura 8: Árbol Familia 105C

677C

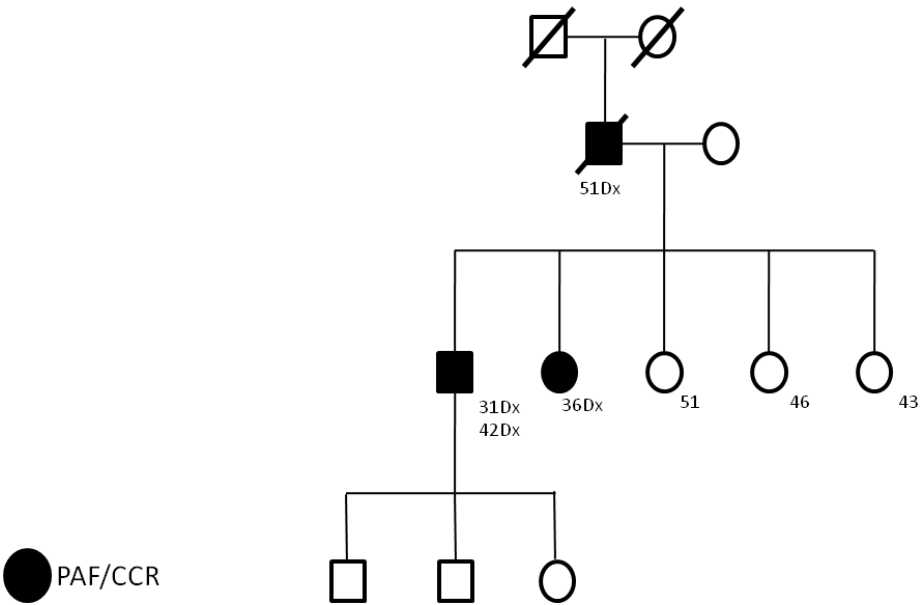
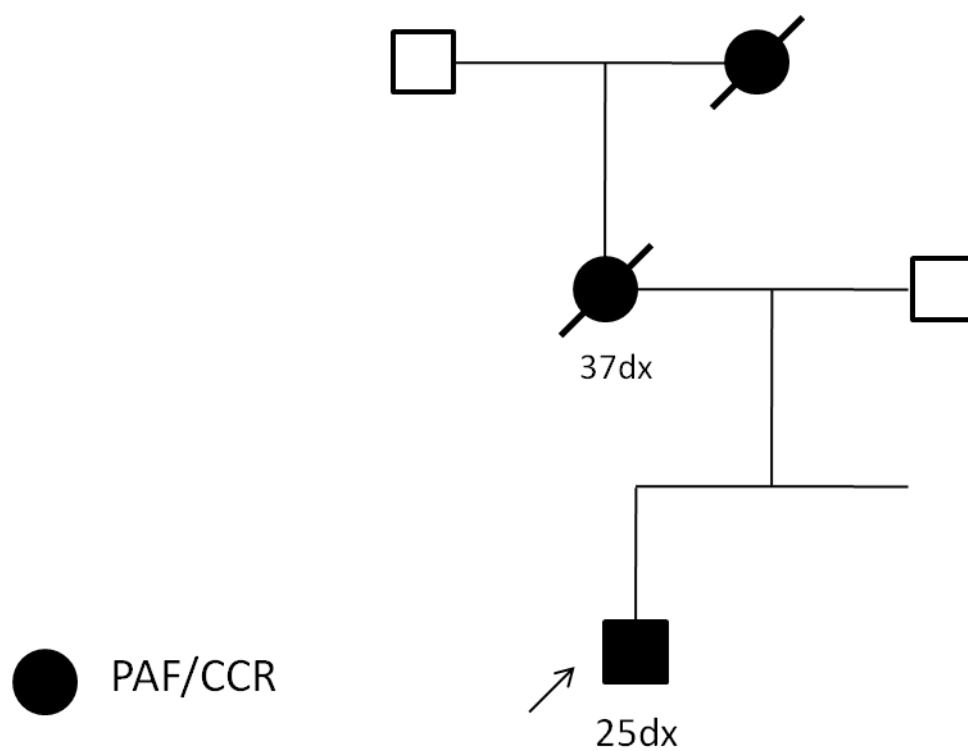


Figura 9: Árbol Familia 677C

323-00C



**Figura 10:** Árbol Familia 323C



---



ÁGINAS WEB





<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>  
<http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite?rm=t input single>  
<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>  
<http://genepattern.broadinstitute.org>  
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>  
<http://www.lovd.nl/2.0/>  
<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>  
<http://www.1000genomes.org/>  
<http://www.mirbase.org/>  
<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi?process=home>  
<http://www.promega.com/country.aspx?returnurl=http%3A%2F%2Fwww.promega.com%2F>  
<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=fNPBLedDVp38p\CxU2h0mQ||>  
<http://www.zymoresearch.com/>  
[www.genome.jp/dbgetbin/www\\_bget?pathway+hsa04310](http://www.genome.jp/dbgetbin/www_bget?pathway+hsa04310)  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/transview?db=core;transcript=ENST00000257430](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/transview?db=core;transcript=ENST00000257430)  
<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3 www.cgi>  
: <http://www.kbioscience.co.uk/download/KASP.swf>

---



**NEXO 2:**

**PUBLICACIONES FRUTO  
DE ESTA TESIS**



# Clinical and genetic characterization of classical forms of familial adenomatous polyposis: a Spanish population study

B. Rivera<sup>1,2</sup>, S. González<sup>3</sup>, E. Sánchez-Tomé<sup>2</sup>, I. Blanco<sup>4</sup>, F. Mercadillo<sup>2</sup>, R. Letón<sup>5</sup>, J. Benítez<sup>1,2</sup>, M. Robledo<sup>1,5</sup>, G. Capellá<sup>6</sup> & M. Urioste<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia; <sup>2</sup>Human Genetics Group, Human Cancer genetics Programme, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid; <sup>3</sup>Molecular Diagnosis Unit, Hereditary Cancer Program, IDIBELL-Catalan Institute of Oncology, Barcelona; <sup>4</sup>Genetic Counseling Unit, Hereditary Cancer Program, IDIBELL and FIGTP-Catalan Institute of Oncology, Barcelona; <sup>5</sup>Hereditary Endocrine Cancer Group, Human Cancer Genetics Programme, CNIO, Madrid; <sup>6</sup>Hereditary Cancer Program, IDIBELL-Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain

Received 4 May 2010; revised 22 July 2010; accepted 23 July 2010

**Background:** Classical familial adenomatous polyposis (FAP) is characterized by the appearance of >100 colorectal adenomas.

**Patients and Methods:** We screened the *APC* and *MUTYH* genes for mutations and evaluated the genotype–phenotype correlation in 136 Spanish classical FAP families.

**Results:** *APC/MUTYH* mutations were detected in 107 families. Sixty-four distinct *APC* point mutations were detected in 95 families of which all were truncating mutations. A significant proportion (39.6%) had not been previously reported. Mutations were spread over the entire coding region and great rearrangements were identified in six families. Another six families exhibited biallelic *MUTYH* mutations. No *APC* or *MUTYH* mutations were detected in 29 families. These *APC/MUTYH*-negative families showed clinical differences with the *APC*-positive families. A poor correlation between phenotype and mutation site was observed.

**Conclusions:** Our results highlight that a broad approach in the genetic study must be considered for classical FAP due to involvement of both *APC* and *MUTYH* and the heterogeneous spectrum of *APC* mutations observed in this Spanish population. The scarcely consistent genotype–phenotype correlation does not allow making specific recommendations regarding screening and management. Differences observed in *APC/MUTYH*-negative families may reflect a genetic basis other than mutations in *APC* and *MUTYH* genes for FAP predisposition.

**Key words:** *APC* gene, colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, genotype–phenotype correlation, *MUTYH* gene, Spanish population

## introduction

Familial adenomatous polyposis (FAP) is an autosomal dominant syndrome characterized by the development of multiple adenomas throughout the colorectum. Some of the polyps will inevitably evolve into carcinomas, if no surgical measures are taken. Approximately 70% of patients also suffer from a variety of extracolonic alterations. In addition to a high risk for colorectal cancer, patients also have increased risk for other cancers like papillary thyroid cancer, hepatobiliary tract tumors, and brain tumors [1]. There are two FAP phenotypes: the classical form with manifestations of >100 colorectal adenomas and with a *de novo* rate of 30%–40% of cases, while the attenuated form of familial adenomatous polyposis (AFAP) is characterized by

a milder course of the disease [2–4]. Adenomatous polyposis coli (*APC*) is a tumor suppressor gene that controls  $\beta$ -catenin turnover in the Wnt pathway. Mutations in *APC* gene are responsible for the majority of FAP cases [5].

The germline mutation detection rate in *APC* depends on the clinical features of the FAP patients and the technique used. On average, mutations can be detected in 85% of classical FAP families, while only 20%–30% of AFAP cases will exhibit a germline *APC* mutation [2, 6].

Molecular screening of *APC* is a time-consuming process. More than 1000 different *APC* germline mutations have been reported and are stored in public databases ([www.hgmd.cf.ac.uk/ac](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac), [www.lovd.nl/2.0/index\\_list.php](http://www.lovd.nl/2.0/index_list.php) and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC147178/pdf/260269.pdf>). These mutations are distributed along the gene and frequently produce a truncated protein [7]. In spite of the large number of *APC* mutations already described, it is still common to find novel *APC* mutations in patients affected by polyposis, which underscores the

\*Correspondence to: Dr M. Urioste, Human Genetics Group, Human Cancer Genetics Programme, National Spanish Cancer Research Centre, Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 Madrid, Spain. Tel: +34-917328000 ext.3315; Fax: +34-912246980. E-mail: [murioste@cnio.es](mailto:murioste@cnio.es)

heterogeneity of *APC* mutations causing FAP [8, 9]. However, no germline mutations are detected in 30%–50% of clinically diagnosed FAP or AFAP patients [1], suggesting the existence of other loci responsible for the disease. *MUTYH* is the second FAP-related gene [10]. The *MUTYH* gene product is involved with base–excision repair of DNA damaged by oxidative stress [9]. *MUTYH* mutations account for 10%–20% of classical FAP cases without a mutation in *APC* and for 30% of AFAP cases [11]. *MUTYH*-associated polyposis (MAP) may be considered a phenocopy of FAP [12].

Genotype–phenotype correlation in FAP syndrome (reviewed by Nieuwenhuis and Vasen) has clinical interest since it contributes to better genetic counseling and simplifies mutation screening. In some studies, an association between location of the mutation and clinical manifestations could be established. However, it is not known if these correlations are population specific, and therefore, it is important to incorporate genetic and clinical data of FAP families from other populations. The present study shows the analysis of the *APC*/*MUTYH* genes in a large series of 136 Spanish families classified as having classical FAP as well as the correlation of *APC*/*MUTYH* mutations with clinical and familial characteristics of the patients. We studied only classical FAP families with the aim of increasing homogeneity in our series, permitting us to carry a comprehensive and in-depth analysis to accurately describe mutation frequencies and further define the FAP-associated phenotype.

## patients and methods

One hundred and thirty-six *probandi* suspected of having FAP received genetic counseling and were molecularly studied at two different Spanish centers (Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain, and FIGTP-Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain). Both centers are considered reference centers that receive samples from different Spanish Autonomous Communities. A detailed family pedigree and clinical history of all affected members were collected. All patients provided informed consent.

### DNA extraction and genetic testing

DNA was obtained from peripheral blood lymphocytes using the MagNA PURE LC Instrument (Roche) following the manufacturer's recommendations. Denaturing high-performance liquid chromatography and direct sequencing were used to detect point mutations in the *APC* gene. Primers, probes, and PCR conditions are available upon request.

Samples negative for point mutations were studied for gross rearrangements (GR) using the MLPA test kit (SALSA P043 *APC* exon deletion test kit, MRC-Holland) following the manufacturer's protocol or by Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescence fragments as described by Castellsagué et al. [13], depending on the center where they were studied. When GR *APC* tests were negative, the two recurrent variants (Tyr165Cys and Gly382Asp) of the *MUTYH* gene were screened.

Mutations in *APC* or *MUTYH* were considered deleterious if they were classified as pathological in the HGMD (Human Gene Mutation Database) database. In cases where we identified a previously undescribed mutation, we studied 1000 healthy volunteers and carried out segregation studies among the affected members of the family. Once a mutation was identified in a family, genetic counseling and molecular testing were offered to other relatives.

### statistical tests

Statistical tests were carried out using SPSS 17.0, applying chi-square or Fisher's exact tests when required to analyze categorical data. Analysis of

variance and Student's *t*-test were employed to analyze continuous data comparing the four groups of families: *APC* positive, *MUTYH* positive, *APC*-GR positive, and *APC*/*MUTYH* negative.

## results

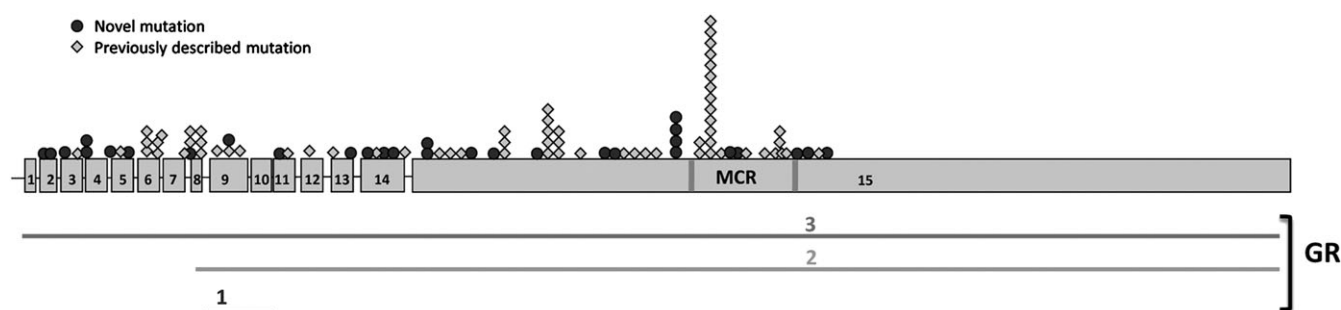
A total of 136 families from two Spanish centers with a clinical diagnosis of classical FAP were included in this study. Of these patients, 81 (59.6%) had a family history of adenomatous polyposis. The remaining 55 (40.4%) patients were apparently the first case in the family. In 12 cases, it was possible to confirm the *de novo* nature of FAP, while difficulties in obtaining DNA samples (death of parents or lack of collaboration of other family members) from other relatives prevented us from unequivocally confirming the *de novo* origin in other 43 remaining cases.

We identified mutations in 107 families (78.7%) with similar mutation detection rates and types for both participant Spanish centers. Table 1 summarized types and frequency of mutations identified. *APC* and *MUTYH* mutations are described in supplemental Tables S1 and S2 (available at *Annals of Oncology* online) and in Figure 1. All the *APC* mutations were truncating. No missense *APC* mutations were detected in this series of classical FAP patients. All *MUTYH*-positive cases exhibited a recessive inheritance pattern.

**Table 1.** Types of mutations and rates of novel and recurrent mutations in the *APC* gene

	Familial FAP, n (%)	Nonfamilial FAP, n (%)	Total, n (%)
Cases	83 (61)	53 (39)	136 (100)
<i>APC</i> mutation positive	65 (64.4)	36 (35.6)	101 (74.3)
Type of mutations			
Small deletion	34 (52.3)	14 (38.9)	48 (47.5)
Nonsense	20 (30.7)	10 (27.8)	30 (29.7)
Small insertion	4 (6.2)	8 (22.2)	12 (11.9)
Splicing	3 (4.6)	2 (5.6)	5 (4.9)
Great rearrangements	4 (6.2)	2 (5.6)	6 (5.9)
Different mutations	41	28	64
Previously described mutations	26	18	38 (59.4)
Novel mutations	15	10	25 (39.6)
Recurrent <sup>a</sup> mutations			
<i>c.423-2A&gt;G</i>	2	0	2
<i>c.646C&gt;T</i>	1	2	3
<i>c.694C&gt;T</i>	1	1	2
<i>c.847C&gt;T</i>	1	1	1
<i>c.2327_2328delTA</i>	2	0	2
<i>c.2805C&gt;A</i>	2	0	2
<i>c.3183_3187delACAAA</i>	4	1	5
<i>c.3202_3205delTCAA</i>	3	0	3
<i>c.3562_3565delCCTT</i>	3	0	3
<i>c.3880C&gt;T</i>	2	0	2
<i>c.3927_3931delAAAGA</i>	6	6	12
<i>c.4394_4395delAG</i>	3	0	3

<sup>a</sup>Recurrent mutations are considered those that appear in more than one family in the present series.



**Figure 1.** Schematic representation of the location of mutations and great rearrangements (GR) along the *APC* gene. Gray diamonds indicate previously described mutations, whereas black circles indicate novel mutations. Exons are numbered. MCR, mutation cluster region.

Mutations were identified between codons 49 and 1569 of the *APC* gene (Figure 1). Exon 15 harbored 58.4% of all mutations, and no mutations were detected in exons 1, 4, 7, and 10.

Twenty-four point mutations (25.3%) were located in the mutation cluster region (MCR; codons 1286–1513 [14, 15]). The hot spots at codons 1061 and 1309 appeared mutated in 4.9% (5/101) and 11.9% (12/101) of our families, respectively.

Of the sixty-four different mutations identified, 25 (39.1%) had not been previously described (Table 1 and Figure 1). The frequency and type of extracolonic manifestations (EM) as well as the age of onset associated with these novel mutations were indistinguishable from previously described *APC* mutations.

We analyzed haplotypes associated with two mutations that appear in five or more unrelated families (data not shown) but failed to identify a common haplotype for families with either mutation, indicating that a common origin for these mutations is improbable.

## genotype–phenotype correlation

### age of onset

The average age of onset was 33 years (range 1–81) across the entire series with 32 and 35 years for familial cases (1–81) and cases without family history (range 8–63), respectively. The mean age of onset of *APC*-positive cases was 31 (range 1–81) years and 45 (range 22–63) in MAP cases. In general, mutations in the proximity of codon 1309 in the MCR were associated with the earliest age of onset. In patients with MCR mutations, the age of onset was 20 years (range 1–43), while the average age was 34 years (range 12–54) for mutations in the remainder of exon 15, 34 years (range 13–81) for mutations in other parts of *APC*, and 33 years for GR of *APC* (range 18–51) ( $P = 0.001$ ). In this regard, an average onset of 21 years (range 8–33) was observed in our patients with mutations in codon 1309.

### number of polyps

We identified a total of seven families with profuse polyposis (>1000 polyps), one of them without detectable mutations in *APC* or *MUTYH* (Figure 2). Only one patient (ID 54, supplemental Table S3, available at *Annals of Oncology* online) carried a mutation in codon 1309 (Figure 2), and the remaining patients carried mutations in codons 49, 216, 805, 1075, and 1113. Interestingly, we did not observe profuse phenotypes associated to gross *APC* rearrangements. Two novel mutations in this series were associated with the presence of >1000 polyps

(c.145delAAAC and c.3337\_3338delAA, supplemental Table S3, available at *Annals of Oncology* online).

### extracolonic manifestations

EM were reported in 62 cases (45.6%): 45 (55.5%) familial cases and 17 (30.9%) nonfamilial cases. The frequencies of the various EM were probably product of underreporting, and therefore, the figures given represent minimum estimations. Figure 2 shows the distribution of EM according to location of the genetic alteration in the *APC* gene. The highest proportion of EM (14/18; 77.8%) was observed in patients harboring mutations between codons 500 and 1000. More than half of all point mutations (49/95) clustered in the region between codons 1000 and 1569, and almost half of these (24/49, 49%) were associated with some type of EM. We noticed an important variability in the type of EM linked to codons 1061–1068 (six different EM) and 1465 (five different EM).

Upper gastrointestinal (UGI) polyps were the most common EM. They were reported in 29 families (21.3%): 24 *APC*-positive families, 2 MAP families, and 3 families without detectable *APC/MUTYH* mutations (UGI polyps were identified in carriers where mutations were distributed all over the gene).

Desmoid tumors were observed in 19 families (14%): 18 were *APC* positive and 1 had no detectable *APC/MUTYH* mutation. Desmoids appear to be associated with different types of mutations, including GR, mainly between codons 232 and 499 and 805 and 1465. Interestingly, only three of these families harbored mutations beyond codon 1400. We observed only one family (ID 28, supplemental Table S3, available at *Annals of Oncology* online) with more than one relative affected with desmoid tumors.

Osteomas were detected in 15 families (11%) and were associated with all mutation types concentrated between codons 500 and 1000 (Figure 2): 13 *APC*-positive, 1 MAP family, and 1 *APC/MUTYH*-negative family.

Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium (CHPRE) was concentrated between codons 1000 and 1569 (Figure 2) and was reported in only 10 families (7.4%); all of them were *APC*-positive, except *APC/MUTYH*-negative family.

Hepatoblastoma was reported in three families: two of which were *APC* positive and one was *APC/MUTYH* negative. Papillary thyroid carcinoma appeared in two families, one *APC* positive and one *APC/MUTYH* negative. Finally, a duodenal carcinoma was detected in one *APC*-positive family and in one

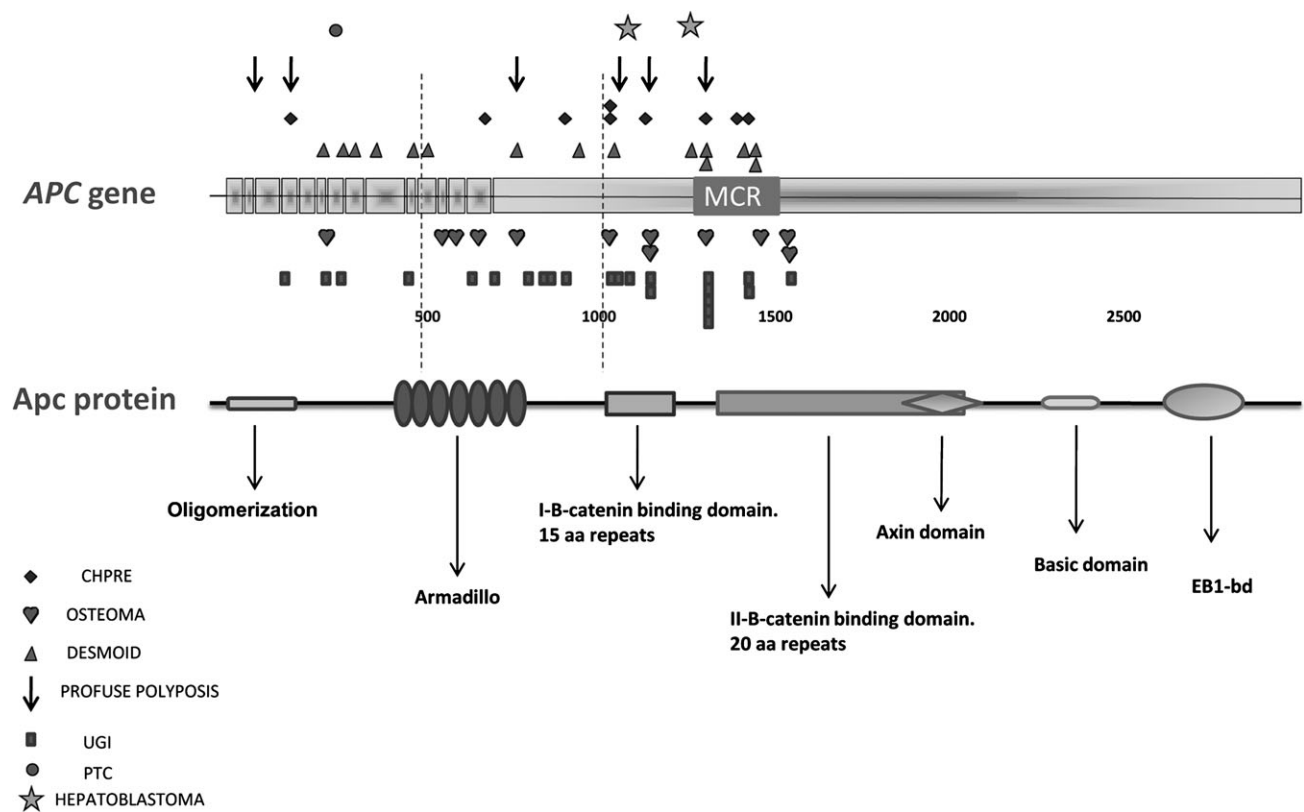


Figure 2. Correlation between extracolonic manifestations and site of APC mutation.

MUTYH-positive family, and gastric carcinoma was observed in two cases without detectable APC/MUTYH mutations.

FAP families with a negative genetic testing

We compared main clinical characteristics between families with APC aberrations (n = 101) and those without detectable APC/MUTYH mutations (Table 2). Considering only nonfamilial cases, in order to avoid bias introduced by earlier age of detection in cases with a family history of FAP, mean age of onset was 30 years in APC-positive and 42 in APC/MUTYH-negative cases (P = 0.004).

Differences were also apparent regarding the presence of EM: 50.3% of the APC-positive cases had some type of EM, while this percentage dropped to 27.6% of APC/MUTYH-negative cases (P = 0.024). The proportion of cases without family history was modestly higher, while presence of profuse polyposis appeared to be lower in the APC/MUTYH-negative group, but these differences were not statistically significant. The frequency of CHPRE, desmoid tumors, UGI polyps, and osteomas was nearly half for APC/MUTYH-negative patients relative to APC-positive patients. By contrast, the presence of tumors other than colorectal was higher in APC/MUTYH-negative families.

discussion

APC mutations

There is limited and scattered information on the APC mutation spectrum in the Spanish population. Here, we

Table 2. Differences between APC-positive and APC/MUTYH-negative families regarding some clinical characteristics

Clinical characteristics	APC+ <sup>a</sup> , N = 101	APC/MUTYH- <sup>a</sup> , N = 29	P value
Familial/nonfamilial cases (%)	64.4/35.6	48.3/51.7	NS <sup>b</sup>
Profuse <sup>c</sup> forms (%)	5.9	3.5	NS <sup>d</sup>
Age of onset (years)			
All cases	31	40	0.002 <sup>e</sup>
Nonfamilial cases	30	42	0.004 <sup>e</sup>
EM development (%)	50.5	27.6	0.024 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>APC-positive group includes mutations and great rearrangements.  
<sup>b</sup>Chi-square test was used to analyzed categorical data.  
<sup>c</sup>Cases are considered profuse when more than 1000 polyps are developed.  
<sup>d</sup>Fisher's exact test was used to analyze categorical data when one of the groups was composed by less that five individuals.  
<sup>e</sup>t-test was carried out to compare mean values of onset.  
NS, not significant; EM, extracolonic manifestations.

provide results of the mutation screening of the APC and MUTYH genes in a series of 136 Spanish families with classical FAP from many different geographical areas of the country, which has allowed us to expand the knowledge about the APC mutational spectrum in the Spanish population. Previous studies were carried out on Spanish populations from Northwestern and Southern regions and from the Balearic Islands. These data suggest various differences with other populations [16–19]. Thus, we carried out a comprehensive analysis in a large Spanish series to assess the validity of these



differences. We detected deleterious germline mutations in 78.7% of the patients, and, this number increased to 82.7% when only familial cases were considered. This detection rate is at the upper end of the range (50%–85%) previously described for classical FAP [20, 21]. The proportions of the different mutation types in our series overlap with those appearing in the HGMD database, with small deletions representing ~40% of all mutations. In our series, GR represent 5.9% of all *APC* mutations, similar to the 6.7% registered in HGMD, although in a recent paper, a GR frequency of 12% was reported in FAP cases [22]. The number of novel mutations (25 in our series) was also similar to that described for other European populations [23–26]. Besides, we identified 13 mutations, 3 of which were previously undescribed, that appear in more than one family. A founder effect of the *c.3183\_3187delACAAA APC* mutation was previously reported in the Spanish Balearic Islands [18]. We failed to demonstrate a common haplotype in cases with this mutation as well as those 12 cases with the 1309 mutation.

*APC* mutations, all of them truncating, were distributed between codons 49 and 1569. Importantly, more than half of all mutations were located in the first half of exon 15. The MCR contained 25.3% of all point mutations, which coincides with the range reported in the Italian, German, and Norwegian populations (3.6%–34%) [8, 27–31]. Mutations in codons 1061 and 1309 represented 5.3% and 12.6%, respectively, of the *APC* point mutations in our series, clearly below the 8% and 20% previously reported [32, 33] but similar to that described in other Spanish and European populations [19, 23, 34–37]. We detected eight classical FAP cases with mutations in areas reportedly associated with attenuated forms of FAP (four mutations upstream of codon 157 and four mutations downstream of codon 1516). This underscores the need to include these areas in mutational screening of the *APC* gene [38, 39].

Mutations in *MUTYH* have been suggested to be the major cause of the attenuated version of the syndrome, although they have also been reported in classical FAP patients [40]. However, we found six cases of classical FAP associated with *MUTYH* mutations. The distribution and frequency of *APC* mutations and *MUTYH* mutations in our population suggest that a broader approach must be considered for classical FAP studies, including the 3' and 5' extremes of the *APC* gene in order to increase mutation detection yield and *MUTYH* screening in *APC*-negative cases.

### genotype–phenotype correlation

Genotype–phenotype correlation studies may help defining the most likely phenotype associated with a given mutation. The identification of *APC* mutation carriers with a well-documented phenotype will allow for the establishment of more accurate surveillance programs and the adjustment of prophylactic surgical treatment.

Mutations affecting the MCR, especially codon 1309, relate with the youngest ages of diagnosis [41, 42], reinforcing the notion that this location associates with a more severe phenotype [1, 30, 43]. We found that the mean age of onset in nonfamilial *APC*-positive patients was 30 years, similar to that reported in recent publications [41, 42, 44, 45]. It should be

noted that the age of onset was only considered in nonfamilial cases to avoid introducing bias related to an earlier detection of cases with a positive family history.

Seven families presented profuse forms of polyposis; one case resulted *APC/MUTYH* negative, while the remaining six patients had mutations along the entire *APC* gene. These include a mutation in codon 1309, classically associated with profuse forms, but also one in codon 49, previously associated with AFAP. The latter finding does not support the hypothesis that a 5'-terminal mutation effect can be partially compensated by the activation of a second translation start at position 184, yielding a partially active *APC* protein [46]. Furthermore, the latter again highlights the great expression variability exhibited by different mutations along the *APC* sequence. Thus, we suggest that these two novel mutations associated to profuse forms (*c.145delAAAC* and *c.3337\_3338delAA*, supplemental Table 3, available at *Annals of Oncology* online) be taken into account for genetic counseling.

The distribution pattern of mutations in relation with EM showed some differences with previously described series (Figure 2). Half of our *APC*-positive or *MUTYH*-positive families developed EM. This proportion likely reflects an underdiagnosis of benign lesions, but not severe complications. Eighteen of the 19 families presenting desmoid tumors had a detectable *APC* mutation mainly located between codons 232 and 499 and 805 and 1465 (Figure 2). In contrast, only three desmoids were associated with mutations beyond codon 1400, an area classically associated with the presence of desmoid tumors [1]. Although desmoids have been linked to a strong family history [47], only one family with several desmoid-affected members was reported.

We also observed an important proportion of UGI polyps and CHPRE associated to mutations located outside the classically described sites. Finally, we detected mutations in AFAP-related areas of the *APC* gene associated with profuse forms of FAP. The lack of an evident genotype–phenotype correlation in our population, together with the intrafamilial and interfamilial variability observed in our series (data not shown), complicates phenotype predictions based on knowledge of the mutation site. These results preclude making recommendations regarding surveillance and prophylactic measures for Spanish FAP patients.

### *APC/MUTYH*-negative cases

Patients and families with classical FAP without detectable *APC/MUTYH* mutations exhibited some distinct features, such as a lower percentage of EM (desmoids tumors, CHPRE, osteomas and UGI polyps) and a later age of onset (42 versus 30 years in nonfamilial cases). Furthermore, a higher incidence of extracolonic tumors was observed among *APC/MUTYH*-negative families. We observed two gastric carcinomas: one papillary thyroid carcinoma and one hepatoblastoma among these negative cases. It remains elusive whether or not these differences reflect *APC* or *MUTYH* inactivation via mechanisms yet to be identified or by a distinct etiology all together. Although the number of cases were limited, these *APC/MUTYH*-negative families probably constitute a heterogeneous group [48]. Notwithstanding, until underlying mechanisms have been elucidated, members of these negative

families should be managed according to guidelines for surveillance and treatment measures established for classical FAP patients.

In conclusion, the data from the present series expand our knowledge of the genetic basis and the clinical manifestations of classical FAP. The detection rate and the type of *APC* mutations in the Spanish population are similar to those described for other European populations. No missense mutations were identified; in fact, all of them led to protein truncation. According to our results, even if broad genetic screening for mutations in *APC* and *MUTYH* was carried out in all cases, some 20% of classical FAP patients will remain without a detectable *APC/MUTYH* mutation. These negative cases present clinical differences that could be related to a different genetic basis. Finally, the lack of a clear genotype–phenotype correlation in our population should be kept in mind for genetic counseling and the clinical management of these patients.

## funding

Centro de Investigaciones en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), and FPU (Formación del Profesorado Universitario: AP-2008-00344), Ministry of Education, Spanish Government.

## acknowledgements

We thank Aguirre de Cubas for his help.

## disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

## references

- Nieuwenhuis MH, Vasen HF. Correlations between mutation site in *APC* and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 61: 153–161.
- Rozen P, Winawer SJ, Wayne JD. Prospects for the worldwide control of colorectal cancer through screening. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 755–759.
- Bussey H. Familial Polyposis Coli. Family Studies, Histopathology, Differential Diagnosis, and Results of Treatment. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press 1975.
- Leppert M, Dobbs M, Scambler P et al. The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 1987; 238: 1411–1413.
- Jaiswal AS, Narayan S. A novel function of adenomatous polyposis coli (*APC*) in regulating DNA repair. *Cancer Lett* 2008; 271: 272–280.
- Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H et al. *MUTYH*-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 2006; 119: 807–814.
- Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer* 2006; 5: 221–226.
- Andresen PA, Heimdal K, Aaberg K et al. *APC* mutation spectrum of Norwegian familial adenomatous polyposis families: high ratio of novel mutations. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1463–1470.
- Lu AL, Li X, Gu Y et al. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys* 2001; 35: 141–170.
- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J et al. Inherited variants of *MYH* associated with somatic G: C→T: a mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002; 30: 227–232.
- Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006; 25: 7531–7537.
- Lindor NM. Hereditary colorectal cancer: MYH-associated polyposis and other newly identified disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 75–87.
- Castellsague E, Gonzalez S, Nadal M et al. Detection of *APC* gene deletions using quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Clin Chem* 2008; 54: 1132–1140.
- Miyoshi Y, Ando H, Nagase H et al. Germ-line mutations of the *APC* gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4452–4456.
- Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the *APC* (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat* 1993; 2: 425–434.
- Ruiz-Ponte C, Vega A, Carracedo A, Barros F. Mutation analysis of the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene in northwest Spanish patients with familial adenomatous polyposis (FAP) and sporadic colorectal cancer. *Hum Mutat* 2001; 18: 355.
- Garcia-Lozano JR, Cordero C, Fernandez-Suarez A et al. *APC* germ-line mutations in southern Spanish patients with familial adenomatous polyposis: genotype-phenotype correlations and identification of eight novel mutations. *Genet Test* 2005; 9: 37–40.
- Gonzalez S, Blanco I, Campos O et al. Founder mutation in familial adenomatous polyposis (FAP) in the Balearic Islands. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 158: 70–74.
- Gomez-Fernandez N, Castellvi-Bel S, Fernandez-Rozadilla C et al. Molecular analysis of the *APC* and *MUTYH* genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet* 2009; 10: 57.
- Michils G, Tejpar S, Thoelen R et al. Large deletions of the *APC* gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. *Hum Mutat* 2005; 25: 125–134.
- Cao X, Hong Y, Eu KW et al. Singapore familial adenomatous polyposis (FAP) patients with classical adenomatous polyposis but undetectable *APC* mutations have accelerated cancer progression. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2810–2817.
- Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S et al. Large submicroscopic genomic *APC* deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *J Med Genet* 2005; 42: 185–192.
- Friedl W, Caspari R, Sengteller M et al. Can *APC* mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 2001; 48: 515–521.
- De Rosa M, Dourisboure RJ, Morelli G et al. First genotype characterization of Argentinean FAP patients: identification of 14 novel *APC* mutations. *Hum Mutat* 2004; 23: 523–524.
- Mihalatos M, Danielides I, Belogianni J et al. Novel mutations of the *APC* gene in familial adenomatous polyposis in Greek patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 141: 65–70.
- Resta N, Stella A, Susca F et al. Nine novel *APC* mutations in Italian FAP patients. *Hum Mutat* 2001; 17: 434–435.
- Friedl MA, Aretz S. Familial adenomatous polyposis: experience from a Study of 1164 unrelated German polyposis patients. *Hered Cancer Clin Pract* 2005; 3: 95–114.
- Aceto G, Cristina Curia M, Veschi S et al. Mutations of *APC* and *MYH* in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum Mutat* 2005; 26: 394.
- De Rosa M, Scarano MI, Panariello L et al. The mutation spectrum of the *APC* gene in FAP patients from southern Italy: detection of known and four novel mutations. *Hum Mutat* 2003; 21: 655–656.
- Plawski A, Slomski R. *APC* gene mutations causing familial adenomatous polyposis in Polish patients. *J Appl Genet* 2008; 49: 407–414.
- Truta B, Allen BA, Conrad PG et al. A comparison of the phenotype and genotype in adenomatous polyposis patients with and without a family history. *Fam Cancer* 2005; 4: 127–133.
- Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1967–1979.
- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of *APC*. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 721–733.

34. Wallis YL, Morton DG, McKeown CM, Macdonald F. Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J Med Genet* 1999; 36: 14–20.
35. Heinimann K, Mullhaupt B, Weber W et al. Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on APC gene mutation status. *Gut* 1998; 43: 675–679.
36. Giarola M, Stagi L, Presciuttini S et al. Screening for mutations of the APC gene in 66 Italian familial adenomatous polyposis patients: evidence for phenotypic differences in cases with and without identified mutation. *Hum Mutat* 1999; 13: 116–123.
37. Aretz S, Uhlhaas S, Caspari R et al. Frequency and parental origin of *de novo* APC mutations in familial adenomatous polyposis. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 52–58.
38. Brensinger JD, Laken SJ, Luce MC et al. Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutation in the APC gene. *Gut* 1998; 43: 548–552.
39. Rozen P, Samuel Z, Shomrat R, Legum C. Notable intrafamilial phenotypic variability in a kindred with familial adenomatous polyposis and an APC mutation in exon 9. *Gut* 1999; 45: 829–833.
40. Lefevre JH, Parc Y, Svrcek M et al. APC, MYH, and the correlation genotype-phenotype in colorectal polyposis. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 871–877.
41. Kanter-Smoler G, Fritzell K, Rohlin A et al. Clinical characterization and the mutation spectrum in Swedish adenomatous polyposis families. *BMC Med* 2008; 6: 10.
42. Won YJ, Park KJ, Kwon HJ et al. Germline mutations of the APC gene in Korean familial adenomatous polyposis patients. *J Hum Genet* 1999; 44: 103–108.
43. Caspari R, Friedl W, Mandl M et al. Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* 1994; 343: 629–632.
44. Ficari F, Cama A, Valanzano R et al. APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Br J Cancer* 2000; 82: 348–353.
45. Bertario L, Russo A, Sala P et al. Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1698–1707.
46. Heppner Goss K, Trzepacz C, Tuohy TM, Groden J. Attenuated APC alleles produce functional protein from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8161–8166.
47. Sturt NJ, Gallagher MC, Bassett P et al. Evidence for genetic predisposition to desmoid tumours in familial adenomatous polyposis independent of the germline APC mutation. *Gut* 2004; 53: 1832–1836.
48. Renkonen ET, Nieminen P, Abdel-Rahman WM et al. Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5651–5659.

## **New *AXIN2* germline variant associates with attenuated FAP without signs of oligodontia or ectodermal dysplasia.**

Rivera B<sup>1</sup>, Perea J<sup>2</sup>, Sánchez E<sup>3</sup>, Villapún M<sup>3</sup>, Sánchez-Tomé E<sup>1</sup>, Mercadillo F<sup>1</sup>, Robledo M<sup>4,5</sup>, Benítez J<sup>1,5</sup>, Urioste M<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup> Human Genetics, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid

<sup>2</sup>General Surgery Service, Hospital 12 de Octubre, Madrid

<sup>3</sup> Gastro-endoscope Service, Clínica Ntra. Sra. Del Rosario, Madrid

<sup>4</sup> Hereditary Endocrine Cancer, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid

<sup>5</sup> Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)

### **SUBMITTED**

**Background:** Truncating mutations in the *AXIN2* gene, a key regulator of  $\beta$ -catenin degradation in the Wnt pathway, have been reported in three families with gastrointestinal adenomatous polyposis and ectodermal dysplasia features. However, the role of *AXIN2* in Familial Adenomatous Polyposis (FAP) syndrome is not completely known.

**Objective:** Our aim was to confirm the implication of *AXIN2* in FAP patients with a negative study of both *APC* and *MUTYH* genes.

**Patients and Methods:** We performed a broad study of *APC* and *MUTYH* genes, discarding their implication in 23 FAP families. In a second step we investigated the role of other genes involved in the Wnt pathway, including the *AXIN2* gene.

**Results:** We described an attenuated FAP family in which a novel missense *AXIN2* variant was identified. Carriers of the variant exhibited a variable number of polyps but none showed any sign of ectodermal dysplasia. We have confirmed the pathogenicity of this novel variant through bioinformatics prediction, control cohort study, LOH analysis, segregation studies and Immunofluorescent staining of Axin2 and  $\beta$ -catenin proteins.

**Conclusion:** This FAP family expands the phenotype related to *AXIN2* alterations and raises the question about the evaluation of *AXIN2* in FAP cases with negative *APC/MUTYH* study.

---



IBLIOGRAFÍA

- Aceto, G., M. Cristina Curia, et al. (2005). "Mutations of APC and MYH in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli." *Hum Mutat* **26**(4): 394.
- Al-Tassan, N., N. H. Chmiel, et al. (2002). "Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors." *Nat Genet* **30**(2): 227-32.
- Alonso A, B. A., Benavides M, Blanco I, Brunet J, García-Foncillas J, González E, González S, Graña B, Guillén C, Lastra E, Mayordomo JI, Pérez P, Robles L, Urioste M, Sociedad Española de Oncología Médica., Ed. (2010). *Cáncer Hereditario II Edición*. Madrid.
- Andresen, P. A., K. Heimdal, et al. (2009). "APC mutation spectrum of Norwegian familial adenomatous polyposis families: high ratio of novel mutations." *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Aretz, S., D. Stienen, et al. (2007). "Somatic APC mosaicism: a frequent cause of familial adenomatous polyposis (FAP)." *Hum Mutat* **28**(10): 985-92.
- Aretz, S., D. Stienen, et al. (2005). "Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis." *J Med Genet* **42**(2): 185-92.
- Aretz, S., S. Uhlhaas, et al. (2004). "Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene." *Hum Mutat* **24**(5): 370-80.
- Babbs, C. F. (1990). "Free radicals and the etiology of colon cancer." *Free Radic Biol Med* **8**(2): 191-200.
- Baglioni, S., G. Melean, et al. (2005). "A kindred with MYH-associated polyposis and pilomatricomas." *Am J Med Genet A* **134A**(2): 212-4.
- Barnetson, R. A., L. Devlin, et al. (2007). "Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer." *Clin Genet* **72**(6): 551-5.
- Bartley, A. N., H. Yao, et al. (2011). "Complex patterns of altered MicroRNA expression during the adenoma-adenocarcinoma sequence for microsatellite-stable colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **17**(23): 7283-93.
- Beaulieu, J. M., X. Zhang, et al. (2008). "Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(4): 1333-8.
- Benedetti, F., A. Bernasconi, et al. (2004). "A single nucleotide polymorphism in glycogen synthase kinase 3-beta promoter gene influences onset of illness in patients affected by bipolar disorder." *Neurosci Lett* **355**(1-2): 37-40.
- Bertario, L., A. Russo, et al. (2003). "Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis." *J Clin Oncol* **21**(9): 1698-707.
- Bisgaard, M. L. and S. Bulow (2006). "Familial adenomatous polyposis (FAP): genotype correlation to FAP phenotype with osteomas and sebaceous cysts." *Am J Med Genet A* **140**(3): 200-4.
- Blumenthal, G. M. and P. A. Dennis (2008). "PTEN hamartoma tumor syndromes." *Eur J Hum Genet* **16**(11): 1289-300.
- Boparai, K. S., E. Dekker, et al. (2008). "Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis." *Gastroenterology* **135**(6): 2014-8.
- Brensinger, J. D., S. J. Laken, et al. (1998). "Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3' mutation in the APC gene." *Gut* **43**(4): 548-52.
- Buchanan, D. D., A. Roberts, et al. "Lessons from Lynch syndrome: a tumor biology-based approach to familial colorectal cancer." *Future Oncol* **6**(4): 539-49.
- Burt, R. W. and K. W. Jaspersion (1993).
- Cao, X., Y. Hong, et al. (2006). "Singapore familial adenomatous polyposis (FAP) patients with classical adenomatous polyposis but undetectable APC mutations have accelerated cancer progression." *Am J Gastroenterol* **101**(12): 2810-7.
- Carl, W. and L. Herrera (1987). "Dental and bone abnormalities in patients with familial polyposis coli." *Semin Surg Oncol* **3**(2): 77-83.
- Caspari, R., W. Friedl, et al. (1994). "Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer." *Lancet* **343**(8898): 629-32.
- Caspari, R., S. Olschwang, et al. (1995). "Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444." *Hum Mol Genet* **4**(3): 337-40.
- Castellsague, E., S. Gonzalez, et al. (2009). "Allele-specific expression of APC in adenomatous polyposis families." *Gastroenterology* **139**(2): 439-47, 447 e1.
- Castellsague, E., S. Gonzalez, et al. (2008). "Detection of APC gene deletions using quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments." *Clin Chem* **54**(7): 1132-40.
- Clark, S. K., K. F. Neale, et al. (1999). "Desmoid tumours complicating familial adenomatous polyposis." *Br J Surg* **86**(9): 1185-9.
- Clendenning, M., D. D. Buchanan, et al. (2011). "Mutation deep within an intron of MSH2 causes Lynch syndrome." *Fam Cancer* **10**(2): 297-301.

- Crabtree, M., O. M. Sieber, et al. (2003). "Refining the relation between 'first hits' and 'second hits' at the APC locus: the 'loose fit' model and evidence for differences in somatic mutation spectra among patients." *Oncogene* **22**(27): 4257-65.
- Cheadle, J. P. and J. R. Sampson (2003). "Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease." *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**: R159-65.
- Chen, C. S., K. D. Phillips, et al. (2006). "Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium (CHRPE) in familial colorectal cancer." *Fam Cancer* **5**(4): 397-404.
- Chen, H., L. Xu, et al. (2008). "A haplotype variation affecting the mitochondrial transportation of hMYH protein could be a risk factor for colorectal cancer in Chinese." *BMC Cancer* **8**: 269.
- Chen, X., J. Weaver, et al. (2008). "Allelic imbalance in BRCA1 and BRCA2 gene expression is associated with an increased breast cancer risk." *Hum Mol Genet* **17**(9): 1336-48.
- Cheng, T. C., S. H. Orkin, et al. (1984). "beta-Thalassemia in Chinese: use of in vivo RNA analysis and oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(9): 2821-5.
- Chimenos-Kustner, E., M. Pascual, et al. (2005). "Hereditary familial polyposis and Gardner's syndrome: contribution of the odonto-stomatology examination in its diagnosis and a case description." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **10**(5): 402-9.
- Choi, B. J., Y. G. Cho, et al. (2006). "Altered expression of the KLF4 in colorectal cancers." *Pathol Res Pract* **202**(8): 585-9.
- Dang, D. T., K. E. Bachman, et al. (2000). "Decreased expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene in intestinal adenomas of multiple intestinal neoplasia mice and in colonic adenomas of familial adenomatous polyposis patients." *FEBS Lett* **476**(3): 203-7.
- De Rosa, M., R. J. Dourisboure, et al. (2004). "First genotype characterization of Argentinean FAP patients: identification of 14 novel APC mutations." *Hum Mutat* **23**(5): 523-4.
- De Rosa, M., M. I. Scarano, et al. (2003). "The mutation spectrum of the APC gene in FAP patients from southern Italy: detection of known and four novel mutations." *Hum Mutat* **21**(6): 655-6.
- de Voer, R. M., N. Hoogerbrugge, et al. (2011). "Spindle-assembly checkpoint and gastrointestinal cancer." *N Engl J Med* **364**(13): 1279-80.
- Derks, S., C. Postma, et al. (2006). "Promoter methylation precedes chromosomal alterations in colorectal cancer development." *Cell Oncol* **28**(5-6): 247-57.
- Dolwani, S., G. T. Williams, et al. (2007). "Analysis of inherited MYH/(MutYH) mutations in British Asian patients with colorectal cancer." *Gut* **56**(4): 593.
- Fearnhead, N. S., M. P. Britton, et al. (2001). "The ABC of APC." *Hum Mol Genet* **10**(7): 721-33.
- Fearon, E. R. (2010). "Molecular genetics of colorectal cancer." *Annu Rev Pathol* **6**: 479-507.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Ficari, F., A. Cama, et al. (2000). "APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis." *Br J Cancer* **82**(2): 348-53.
- Friedl, M. A., S. (2005). "Familial Adenomatous Polyposis: Experience from a Study of 1164 Unrelated German polyposis Patients." *Hereditary Cancer in Clinical Practice* **3**(3): 95-114.
- Friedl, W., R. Caspari, et al. (2001). "Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families." *Gut* **48**(4): 515-21.
- Garcia-Lozano, J. R., C. Cordero, et al. (2005). "APC germ-line mutations in southern Spanish patients with familial adenomatous polyposis: genotype-phenotype correlations and identification of eight novel mutations." *Genet Test* **9**(1): 37-40.
- Gardner, E. J. (1951). "A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum." *Am. J. Hum. Genet.* **(3)**: 167-176.
- Gardner, E. J. and R. C. Richards (1953). "Multiple cutaneous and subcutaneous lesions occurring simultaneously with hereditary polyposis and osteomatosis." *Am J Hum Genet* **5**(2): 139-47.
- Garzon, R., G. A. Calin, et al. (2009). "MicroRNAs in Cancer." *Annu Rev Med* **60**: 167-79.
- Ghaleb, A. M., J. P. Katz, et al. (2007). "Kruppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following gamma-radiation-induced DNA damage." *Oncogene* **26**(16): 2365-73.
- Giardiello, F. M., J. D. Brensinger, et al. (1997). "The use and interpretation of commercial APC gene testing for familial adenomatous polyposis." *N Engl J Med* **336**(12): 823-7.
- Giardiello, F. M., G. M. Petersen, et al. (1996). "Hepatoblastoma and APC gene mutation in familial adenomatous polyposis." *Gut* **39**(6): 867-9.
- Giarola, M., L. Stagi, et al. (1999). "Screening for mutations of the APC gene in 66 Italian familial adenomatous polyposis patients: evidence for phenotypic differences in cases with and without identified mutation." *Hum Mutat* **13**(2): 116-23.



- Gismondi, V., M. Meta, et al. (2004). "Prevalence of the Y165C, G382D and I395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas." *Int J Cancer* **109**(5): 680-4.
- Gomez-Fernandez, N., S. Castellvi-Bel, et al. (2009). "Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations?" *BMC Med Genet* **10**: 57.
- Gonzalez, S., I. Blanco, et al. (2005). "Founder mutation in familial adenomatous polyposis (FAP) in the Balearic Islands." *Cancer Genet Cytogenet* **158**(1): 70-4.
- Goss, K. H. and J. Groden (2000). "Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor." *J Clin Oncol* **18**(9): 1967-79.
- Groden, J., A. Thliveris, et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." *Cell* **66**(3): 589-600.
- Groves, C. J., B. P. Saunders, et al. (2002). "Duodenal cancer in patients with familial adenomatous polyposis (FAP): results of a 10 year prospective study." *Gut* **50**(5): 636-41.
- Half, E., D. Bercovich, et al. (2009). "Familial adenomatous polyposis." *Orphanet J Rare Dis* **4**: 22.
- Hamilton SR, L. B., Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B. et al. (1995). "The molecular basis of Turcot's syndrome." *N Engl J Med* **332**: 839-47.
- Handra-Luca, A., C. Condroyer, et al. (2005). "Vessels' morphology in SMAD4 and BMPRIA-related juvenile polyposis." *Am. J. Med. Genet.* (138a): 113-117.
- Hanks, S., K. Coleman, et al. (2004). "Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B." *Nat Genet* **36**(11): 1159-61.
- Hanson, C. A. and J. R. Miller (2005). "Non-traditional roles for the Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor protein." *Gene* **361**: 1-12.
- Heinen, C. D. (2009). "Genotype to phenotype: Analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families." *Mutat Res.*
- Heinimann, K., B. Mullhaupt, et al. (1998). "Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on APC gene mutation status." *Gut* **43**(5): 675-9.
- Heppner Goss, K., C. Trzepacz, et al. (2002). "Attenuated APC alleles produce functional protein from internal translation initiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8161-6.
- Herman, J. G., J. R. Graff, et al. (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9821-6.
- Herraiz, M., G. Barbesino, et al. (2007). "Prevalence of thyroid cancer in familial adenomatous polyposis syndrome and the role of screening ultrasound examinations." *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**(3): 367-73.
- Herrera, L., S. Kakati, et al. (1986). "Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q." *Am J Med Genet* **25**(3): 473-6.
- Hes, F. J., M. Nielsen, et al. (2008). "Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli." *Gut* **57**(1): 71-6.
- Highsmith, W. E., L. H. Burch, et al. (1994). "A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations." *N Engl J Med* **331**(15): 974-80.
- Huang, S. M., Y. M. Mishina, et al. (2009). "Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling." *Nature* **461**(7264): 614-20.
- Hughes, L. J. and V. V. Michels (1992). "Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis." *Am J Med Genet* **43**(6): 1023-5.
- Hur, E. M. and F. Q. Zhou (2010). "GSK3 signalling in neural development." *Nat Rev Neurosci* **11**(8): 539-51.
- Isidro, G., F. Laranjeira, et al. (2004). "Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas." *Hum Mutat* **24**(4): 353-4.
- Jacobs, K. M., S. R. Bhawe, et al. (2012). "GSK-3beta: A Bifunctional Role in Cell Death Pathways." *Int J Cell Biol* **2012**: 930710.
- Janinis, J., M. Patriki, et al. (2003). "The pharmacological treatment of aggressive fibromatosis: a systematic review." *Ann Oncol* **14**(2): 181-90.
- Jarvinen, H. J., P. Peltokallio, et al. (1982). "Gardner's stigmas in patients with familial adenomatosis coli." *Br J Surg* **69**(12): 718-21.
- Jasperson, K. W., T. M. Tuohy, et al. (2010). "Hereditary and familial colon cancer." *Gastroenterology* **138**(6): 2044-58.
- Jeghers, H., V. A. McKusick, et al. (1949). "Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits." *New Eng. J. Med.* **241**: 993-1005.

- Jenkins, M. A., M. E. Croitoru, et al. (2006). "Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(2): 312-4.
- Jones, N., S. Vogt, et al. (2009). "Increased colorectal cancer incidence in obligate carriers of heterozygous mutations in MUTYH." Gastroenterology **137**(2): 489-94, 494 e1; quiz 725-6.
- Jones, S., P. Emmerson, et al. (2002). "Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations." Hum Mol Genet **11**(23): 2961-7.
- Joslyn, G., M. Carlson, et al. (1991). "Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus." Cell **66**(3): 601-13.
- Kadmon, M., A. Tandara, et al. (2001). "Duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis coli. A review of the literature and results from the Heidelberg Polyposis Register." Int J Colorectal Dis **16**(2): 63-75.
- Kanter-Smoler, G., K. Fritzell, et al. (2008). "Clinical characterization and the mutation spectrum in Swedish adenomatous polyposis families." BMC Med **6**: 10.
- Kerkela, R., L. Kockeritz, et al. (2008). "Deletion of GSK-3beta in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation." J Clin Invest **118**(11): 3609-18.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.
- Knudsen, A. L., M. L. Bisgaard, et al. (2003). "Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature." Fam Cancer **2**(1): 43-55.
- Knudsen AL, B. M., Bülow S. (2003). "Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature." Fam Cancer **2**(1): 43-45.
- Knudsen, A. L., S. Bulow, et al. (2010). "Attenuated Familial Adenomatous Polyposis (AFAP) Results from an international collaborative study." Colorectal Dis.
- Knudsen, A. L. B., S. Tomlinson, Möslin, K. Heinimann, I. J. Christensen (2010). "Attenuated Familial Adenomatous Polyposis (AFAP) Results from an international collaborative study." Colorectal Disease **9999**(999A): Epub ahead of print.
- Knudson, A. G. (2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer." Nat Rev Cancer **1**(2): 157-62.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
- Kononen, J., L. Bubendorf, et al. (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med **4**(7): 844-7.
- Kwok, J. B., M. Hallupp, et al. (2005). "GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease." Ann Neurol **58**(6): 829-39.
- Lachman, H. M., E. Pedrosa, et al. (2007). "Increase in GSK3beta gene copy number variation in bipolar disorder." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **144B**(3): 259-65.
- Lamlum, H., M. Ilyas, et al. (1999). "The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis." Nat Med **5**(9): 1071-5.
- Lammi, L., S. Arte, et al. (2004). "Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer." Am J Hum Genet **74**(5): 1043-50.
- Laurent-Puig, P., C. Beroud, et al. (1998). "APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines." Nucleic Acids Res **26**(1): 269-70.
- Leary, R. J., J. C. Lin, et al. (2008). "Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16224-9.
- Lefevre, J. H., Y. Parc, et al. (2009). "APC, MYH, and the correlation genotype-phenotype in colorectal polyposis." Ann Surg Oncol **16**(4): 871-7.
- Lejeune, S., F. Guillemot, et al. (2006). "Low frequency of AXIN2 mutations and high frequency of MUTYH mutations in patients with multiple polyposis." Hum Mutat **27**(10): 1064.
- Leppard, B. and H. J. Bussey (1975). "Epidermoid cysts, polyposis coli and Gardner's syndrome." Br J Surg **62**(5): 387-93.
- Liang, Y., D. Ridzon, et al. (2007). "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues." BMC Genomics **8**: 166.
- Lida, M. Y., T., Itoh, H., Watanabe, H., Matsui T., Iwashita, A., Fujishima, M. (1988). "Natural history of gastric adenomas in patients with familial adenomatous coli/Gardner's syndrome." Cancer **61**(1): 605-611.
- Lipton, L. and I. Tomlinson (2006). "The genetics of FAP and FAP-like syndromes." Fam Cancer **5**(3): 221-6.

- Liu, K. J., J. R. Arron, et al. (2007). "Chemical rescue of cleft palate and midline defects in conditional GSK-3beta mice." *Nature* **446**(7131): 79-82.
- Lu, A. L., X. Li, et al. (2001). "Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions." *Cell Biochem Biophys* **35**(2): 141-70.
- Lynch, H., and De la Chapelle, Alberth. (2003). "Hereditary Colorectal Cancer." *N Engl J Med* **2003**;348:919-32.(348): 919-32.
- Lynch, H. T. and A. de la Chapelle (1999). "Genetic susceptibility to non-polypoid colorectal cancer " *J. Med. Genet.* (36): 801-818.
- Lynch, H. T., J. F. Lynch, et al. (2012). "Hereditary gastrointestinal cancer syndromes." *Gastrointest Cancer Res* **4**(4 Suppl 1): S9-S17.
- Lynch, H. T. and P. M. Lynch (1979). "The cancer-family syndrome: a pragmatic basis for syndrome identification." *Dis Colon Rectum* **22**(2): 106-10.
- Lynch, P. L., H. T. (1979). "The cancer-family syndrome: a pragmatic basis for syndrome identification." *Dis. Colon Rectum*(22): 106-110.
- Llompart, A. (1992). "EL REGISTRO DE POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR DE MALLORCA Y MENORCA (1987-1992) . ."
- Mancini, C., G. Vaula, et al. (2012). "Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts type I (MLCI) due to a homozygous deep intronic splicing mutation (c.895-226T>G) abrogated in vitro using an antisense morpholino oligonucleotide." *Neurogenetics*.
- Marsh, D. J., J. B. Kum, et al. (1999). "PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome." *Hum Mol Genet* **8**(8): 1461-72.
- Marvin, M. L., S. M. Mazzone, et al. (2011). "AXIN2-associated autosomal dominant ectodermal dysplasia and neoplastic syndrome." *Am J Med Genet A* **155A**(4): 898-902.
- Matsuura, S., Y. Matsumoto, et al. (2006). "Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome." *Am J Med Genet A* **140**(4): 358-67.
- McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, J. H. U. B., MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). Online Mendelian Inheritance in Man (TM).
- Menezes, R., M. L. Marazita, et al. (2009). "AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer." *J Am Dent Assoc* **140**(1): 80-4.
- Michils, G., S. Tejpar, et al. (2005). "Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study." *Hum Mutat* **25**(2): 125-34.
- Mihalatos, M., I. Danielides, et al. (2003). "Novel mutations of the APC gene in familial adenomatous polyposis in Greek patients." *Cancer Genet Cytogenet* **141**(1): 65-70.
- Moisio, A. L., H. Jarvinen, et al. (2002). "Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a population based study." *Gut* **50**(6): 845-50.
- Mongin, C., F. Coulet, et al. (2011). "Unexplained polyposis: a challenge for geneticists, pathologists and gastroenterologists." *Clin Genet* **81**(1): 38-46.
- Montera, M., F. Piaggio, et al. (2001). "A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family." *J Med Genet* **38**(12): 863-7.
- Mostowska, A., B. Biedziak, et al. (2006). "Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis." *J Hum Genet* **51**(3): 262-6.
- Nagel, R., C. le Sage, et al. (2008). "Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer." *Cancer Res* **68**(14): 5795-802.
- Necker, J., M. Kovac, et al. (2011). "Detection of APC germ line mosaicism in patients with de novo familial adenomatous polyposis: a plea for the protein truncation test." *J Med Genet* **48**(8): 526-9.
- Nielsen, M., E. Bik, et al. (2007). "Genotype-phenotype correlations in 19 Dutch cases with APC gene deletions and a literature review." *Eur J Hum Genet* **15**(10): 1034-42.
- Nielsen, M., P. F. Franken, et al. (2005). "Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP)." *J Med Genet* **42**(9): e54.
- Nielsen M, H. F., Nagengast FM, Weiss MM, Mathus-Vliegen EM, Morreau H, Breuning MH, Wijnen JT, Tops CM, Vasen HF. (2007). " Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. ." *Clin Genet.* (71): 427-33.
- Nieuwenhuis, M. H., L. M. Mathus-Vliegen, et al. (2007). "Genotype-phenotype correlations as a guide in the management of familial adenomatous polyposis." *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**(3): 374-8.

- Nieuwenhuis, M. H. and H. F. Vasen (2007). "Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature." Crit Rev Oncol Hematol **61**(2): 153-61.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, et al. (1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients." Science **253**(5020): 665-9.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, et al. (1991). "Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Cancer Patients." Science **253**: 665-669.
- Offerhaus, G. J., M. M. Entius, et al. (1999). "Upper gastrointestinal polyps in familial adenomatous polyposis." Hepatogastroenterology **46**(26): 667-9.
- Offerhaus, G. J., F. M. Giardiello, et al. (1992). "The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis." Gastroenterology **102**(6): 1980-2.
- Olschwang, S., A. Tiret, et al. (1993). "Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients." Cell **75**(5): 959-68.
- Palacios, R., E. Gazave, et al. (2009). "Allele-specific gene expression is widespread across the genome and biological processes." PLoS One **4**(1): e4150.
- Paraf, F., S. Jothy, et al. (1997). "Brain tumor-polypoid syndrome: two genetic diseases? ." J. Clin. Oncol. (15): 2744-2758.
- Pedace, L., D. Castiglia, et al. (2011). "AXIN2 germline mutations are rare in familial melanoma." Genes Chromosomes Cancer **50**(5): 370-3.
- Peterlongo, P., L. R. Howe, et al. (2005). "Germline mutations of AXIN2 are not associated with nonsyndromic colorectal cancer." Hum Mutat **25**(5): 498-500.
- Petersen, G. M., J. Slack, et al. (1991). "Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage." Gastroenterology **100**(6): 1658-64.
- Peutz, J. L. A. (1921). "Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentations of skin and mucous membrane. ." (Dutch). Nederl. Maandschr. Geneesk. (10): 134-146.
- Plawski, A. and R. Slomski (2008). "APC gene mutations causing familial adenomatous polyposis in Polish patients." J Appl Genet **49**(4): 407-14.
- Polakis, P. (2007). "The many ways of Wnt in cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(1): 45-51.
- Reitamo, J. J., T. M. Scheinin, et al. (1986). "The desmoid syndrome. New aspects in the cause, pathogenesis and treatment of the desmoid tumor." Am J Surg **151**(2): 230-7.
- Renkonen, E. T., P. Nieminen, et al. (2005). "Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous." J Clin Oncol **23**(24): 5651-9.
- Resta, N., A. Stella, et al. (2001). "Nine novel APC mutations in Italian FAP patients." Hum Mutat **17**(5): 434-5.
- Reyes, J., A. Llompert, et al. (2002). "[Osteomatous jaw lesions in familial adenomatous polyposis]." Gastroenterol Hepatol **25**(6): 387-91.
- Reyes Moreno, J., D. Ginard Vicens, et al. (2007). "[Impact of a registry on survival in familial adenomatous polyposis]." Med Clin (Barc) **129**(2): 51-2.
- Rio Frio, T., J. Lavoie, et al. (2010). "Homozygous BUB1B mutation and susceptibility to gastrointestinal neoplasia." N Engl J Med **363**(27): 2628-37.
- Rivera, B., S. Gonzalez, et al. (2011). "Clinical and genetic characterization of classical forms of familial adenomatous polyposis: a Spanish population study." Ann Oncol.
- Rohlin, A., Y. Engwall, et al. (2011). "Inactivation of promoter 1B of APC causes partial gene silencing: evidence for a significant role of the promoter in regulation and causative of familial adenomatous polyposis." Oncogene.
- Romero-Gimenez, J., H. Dopeso, et al. (2008). "Germline hypermethylation of the APC promoter is not a frequent cause of familial adenomatous polyposis in APC/MUTYH mutation negative families." Int J Cancer **122**(6): 1422-5.
- Rouleau, E., H. Zattara, et al. (2011). "First large rearrangement in the MUTYH gene and attenuated familial adenomatous polyposis syndrome." Clin Genet **80**(3): 301-3.
- Rozen, P., Z. Samuel, et al. (1999). "Notable intrafamilial phenotypic variability in a kindred with familial adenomatous polyposis and an APC mutation in exon 9." Gut **45**(6): 829-33.
- Rozen, P., S. J. Winawer, et al. (2002). "Prospects for the worldwide control of colorectal cancer through screening." Gastrointest Endosc **55**(6): 755-9.
- Rubinfeld, B., I. Albert, et al. (1997). "Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene." Cancer Res **57**(20): 4624-30.

- Ruiz-Ponte, C., A. Vega, et al. (2001). "Mutation analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in northwest Spanish patients with familial adenomatous polyposis (FAP) and sporadic colorectal cancer." *Hum Mutat* **18**(4): 355.
- Rustgi, A. K. (2007). "The genetics of hereditary colon cancer." *Genes Dev.* (Rustgi, A. K. : The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* 21: 2525-2538).
- Sampson, J. R., S. Jones, et al. (2005). "MutYH (MYH) and colorectal cancer." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 4): 679-83.
- Schaffer, B. A., L. Bertram, et al. (2008). "Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia." *Arch Neurol* **65**(10): 1368-74.
- Segditsas, S. and I. Tomlinson (2006). "Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway." *Oncogene* **25**(57): 7531-7.
- Shields, J. M., R. J. Christy, et al. (1996). "Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest." *J Biol Chem* **271**(33): 20009-17.
- Sieber, O. M., L. Lipton, et al. (2003). "Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH." *N Engl J Med* **348**(9): 791-9.
- Sieber, O. M., L. Lipton, et al. (2003). "Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH." *New Eng. J. Med.* (348): 791-799.
- Spier, I., S. Horpaopan, et al. (2012). "Deep intronic APC mutations explain a substantial proportion of patients with familial or early-onset adenomatous polyposis." *Hum Mutat* **33**(7): 1045-50.
- Sturt, N. J., M. C. Gallagher, et al. (2004). "Evidence for genetic predisposition to desmoid tumours in familial adenomatous polyposis independent of the germline APC mutation." *Gut* **53**(12): 1832-6.
- Suter, C. M., D. I. Martin, et al. (2004). "Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers." *Nat Genet* **36**(5): 497-501.
- Thakker, N., R. Davies, et al. (1995). "The dental phenotype in familial adenomatous polyposis: diagnostic application of a weighted scoring system for changes on dental panoramic radiographs." *J Med Genet* **32**(6): 458-64.
- Tiret, A. and C. Parc (1999). "Fundus lesions of adenomatous polyposis." *Curr Opin Ophthalmol* **10**(3): 168-72.
- Traboulsi, E. I., A. J. Krush, et al. (1987). "Prevalence and importance of pigmented ocular fundus lesions in Gardner's syndrome." *N Engl J Med* **316**(11): 661-7.
- Treisman, R., S. H. Orkin, et al. (1983). "Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned beta-thalassaemia genes." *Nature* **302**(5909): 591-6.
- Tricarico, R., P. Bet, et al. (2009). "Endometrial cancer and somatic G>T KRAS transversion in patients with constitutional MUTYH biallelic mutations." *Cancer Lett* **274**(2): 266-70.
- Truta, B., B. A. Allen, et al. (2005). "A comparison of the phenotype and genotype in adenomatous polyposis patients with and without a family history." *Fam Cancer* **4**(2): 127-33.
- Utsunomiya, J. and T. Nakamura (1975). "The occult osteomatous changes in the mandible in patients with familial polyposis coli." *Br J Surg* **62**(1): 45-51.
- Valle, L., T. Serena-Acedo, et al. (2008). "Germline allele-specific expression of TGFBR1 confers an increased risk of colorectal cancer." *Science* **321**(5894): 1361-5.
- Vasen, H. F., G. Moslein, et al. (2008). "Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP)." *Gut* **57**(5): 704-13.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-32.
- Vogt, S., N. Jones, et al. (2009). "Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis." *Gastroenterology* **137**(6): 1976-85 e1-10.
- Volinia, S., G. A. Calin, et al. (2006). "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2257-61.
- Wallace MH, P. R. (1998). "Upper gastrointestinal disease in patients with familial adenomatous polyposis. " *Br J Surg* **85**: 742-50.
- Wallis, Y. L., F. Macdonald, et al. (1994). "Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis." *Hum Genet* **94**(5): 543-8.
- Wallis, Y. L., D. G. Morton, et al. (1999). "Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition." *J Med Genet* **36**(1): 14-20.
- Wang, H. L., J. Hart, et al. (2011). "Upregulation of glycogen synthase kinase 3beta in human colorectal adenocarcinomas correlates with accumulation of CTNNB1." *Clin Colorectal Cancer* **10**(1): 30-6.

- Wang, R. Y., C. W. Gehrke, et al. (1980). "Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues." Nucleic Acids Res **8**(20): 4777-90.
- Webb, E. L., M. F. Rudd, et al. (2006). "Colorectal cancer risk in monoallelic carriers of MYH variants." Am J Hum Genet **79**(4): 768-71; author reply 771-2.
- Webb, T. R., D. A. Parfitt, et al. (2012). "Deep intronic mutation in OFDI, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23)." Hum Mol Genet.
- Wehrli, B. M., S. W. Weiss, et al. (2001). "Gardner-associated fibromas (GAF) in young patients: a distinct fibrous lesion that identifies unsuspected Gardner syndrome and risk for fibromatosis." Am J Surg Pathol **25**(5): 645-51.
- Weitz, J., M. Koch, et al. (2005). "Colorectal cancer." Lancet **365**(9454): 153-65.
- Win, A. K., S. P. Cleary, et al. (2010). "Cancer risks for monoallelic MUTYH mutation carriers with a family history of colorectal cancer." Int J Cancer.
- Won, Y. J., K. J. Park, et al. (1999). "Germline mutations of the APC gene in Korean familial adenomatous polyposis patients." J Hum Genet **44**(2): 103-8.
- Wood, L. D., D. W. Parsons, et al. (2007). "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." Science **318**(5853): 1108-13.
- Yan, H., Z. Dobbie, et al. (2002). "Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis." Nat Genet **30**(1): 25-6.